

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2003年 3月28日

出願番号  
Application Number:

特願2003-092923

パリ条約による外国への出願  
用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
country code and number  
of our priority application,  
used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2003-092923

願人  
Applicant(s):

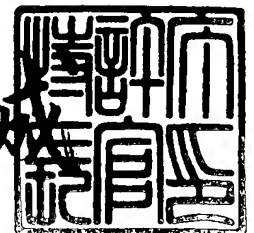
株式会社トランスサイエンス

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2005年12月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中嶋 誠



【書類名】 特許願

【整理番号】 J103519081

【提出日】 平成15年 3月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C04B 24/14

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府豊中市新千里北町 2 丁目 9 番 3 号

    【氏名】 遠山 正彌

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 5 - 2 - 3 0 3

    【氏名】 山下 俊英

【特許出願人】

    【識別番号】 302044546

    【氏名又は名称】 株式会社トランスサイエンス

【代理人】

    【識別番号】 100078282

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 山本 秀策

【選任した代理人】

    【識別番号】 100062409

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 安村 高明

【選任した代理人】

    【識別番号】 100113413

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 森下 夏樹

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 001878

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0210954

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経再生のための組成物および方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 神経を再生するための組成物であって、P e p 5 ポリペプチドを含む、組成物。

【請求項 2】 前記P e p 5 ポリペプチドは、

(a) 配列番号 1 に記載の核酸配列もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】 前記P e p 5 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列の全範囲を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】 神経を再生するための組成物であって、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【請求項 6】 前記P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有する



、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】 前記 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 1 の核酸配列におけるヌクレオチド配列の全範囲を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 9】 神経を再生するための組成物であって、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 1 0】 前記 p 7 5 ポリペプチドは、

(a) 配列番号 3 または 1 6 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそ

のフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】 前記 p 75 ポリペプチドは、配列番号 4 または 17 のアミノ酸配列のうち、それぞれ 273 位～427 位または 274 位～425 位の範囲を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 13】 神経を再生するための組成物であって、p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 14】 前記 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70% である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】 前記 p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 3 または 16 の核酸配列において、それぞれヌクレオチド 1110 位 ~ 1283 位または 1113 位 ~ 1277 位の範囲を含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 16】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 17】 神経を再生するための組成物であって、p 75 細胞外ドメインポリペプチドを含む、組成物。

【請求項 18】 前記 p 75 細胞外ドメインは、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の核酸配列の、それぞれヌクレオチド 198 位 ~ 863 位または 201 位 ~ 866 位もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位 ~ 250 位または 30 位 ~ 251 位もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位 ~ 250 位または 30 位 ~ 251 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体

ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体の配列によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】 前記 p 75 細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号 4 または 17 のアミノ酸、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位の範囲を含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 20】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 21】 前記 p 75 細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 22】 神経を再生するための組成物であって、p 75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【請求項 23】 前記 p 75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸

2 9 位～2 5 0 位または3 0 位～2 5 1 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号3 または1 6 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド1 9 8 位～8 6 3 位または2 0 1 位～8 6 6 位のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号4 または1 7 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸2 9 位～2 5 0 位または3 0 位～2 5 1 位からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも7 0 %である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、請求項2 2 に記載の組成物。

【請求項2 4】 前記p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号3 または1 6 の核酸配列において、それぞれヌクレオチド1 9 8 位～8 6 3 位または2 0 1 位～8 6 6 位の範囲を含む、請求項2 2 に記載の組成物。

【請求項2 5】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項2 2 に記載の組成物。

【請求項2 6】 前記p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、請求項2 2 に記載の組成物。

【請求項2 7】 神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項2 8】 前記R h o G D I ポリペプチドは、

(a) 配列番号 5 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド;

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド;

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド;

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド; または

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70% であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】 前記 R h o G D I ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸の全範囲を含む、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 30】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 31】 神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【請求項 32】 前記 R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド;

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】 前記 R h o G D I は、配列番号 5 の全範囲を含む、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】 前記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 5】 前記神経の再生が、神経突起伸展の阻害を破壊することによるものである、請求項 1、5、9、13、17、22、27 または 31 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 6】 神経を再生するための方法であって、

再生に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコード

する核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、  
を包含する、方法。

【請求項 3 7】 前記神経の再生は、神経突起伸展の阻害を破壊することによる、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】 神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための組成物であって、

診断、予防、処置または予後に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、組成物。

【請求項 3 9】 神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法であって、

診断、予防、処置または予後に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、  
を包含する、方法。

【請求項 4 0】 神経細胞のネットワークの構築のための組成物であって、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D



I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、組成物。

【請求項 4 1】 神経細胞のネットワークの構築のための方法であって、  
ネットワークの構築に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経細胞に与える工程、  
を包含する、方法。

【請求項 4 2】 神経学的疾患を処置するためのキットであって、  
(A) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物によって再生された細胞集団、

(B) 該細胞集団を保存するための容器  
を包含する、キット。

【請求項 4 3】 神経学的疾患を処置するための方法であって、該方法は、  
以下：

(a) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物によって再生さ

れた細胞集団を提供する工程；および

(b) 該細胞集団を該患者に移植する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 4 4】 神経再生を誘導する因子を同定するためのスクリーニング方法であって、該方法は、以下：

(a) 配列番号 4 または 1 7 に少なくとも 7 0 % 相同性であるアミノ酸配列を有する第 1 のポリペプチドまたはそのフラグメントおよび配列番号 6 に少なくとも 7 0 % 相同性であるアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチドまたはそのフラグメントを、試験因子の存在下で接触させる工程、および

(b) 該第 1 のポリペプチドと該第 2 のポリペプチドとの間の結合レベルを、該試験因子の非存在下における結合レベルと比較する工程、  
を包含し、

ここで、該試験因子の非存在下と比較して、試験因子の存在下において結合が減少した場合、該試験因子は、神経を再生するための因子として同定される、方法。

【請求項 4 5】 請求項 4 4 に記載の方法によって同定される、調節因子。

【請求項 4 6】 請求項 4 5 に記載の調節因子を含む、薬学的組成物。

【請求項 4 7】 神経学的疾患、障害または状態を、予防または処置する方法であって、該方法は、請求項 4 6 に記載の薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 4 8】 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、 p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子および R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの核酸分子の配列において野生型とは異なる配列が導入された配列を有する核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 4 9】 請求項 4 8 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 5 0】 請求項 4 8 に記載のベクターを含む、組織。

【請求項 5 1】 請求項 4 8 に記載のベクターを含む、臓器。

【請求項 5 2】 請求項 4 8 に記載のベクターを含む、生物。

【請求項 5 3】 請求項 4 8 に記載のベクターで形質転換された、神経改変

トランスジェニック動物。

【請求項 5 4】 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、 p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子および R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される核酸分子が欠失された、神経改変ノックアウト動物。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、神経学的疾患を処置するための薬学的組成物および方法、ならびに神経を再生する薬学的組成物および方法に関する。詳細には、神経突起伸展の阻害を破壊することによって、神経学的疾患を処置する薬学的組成物および方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

ニューロトロフィンレセプター ( p 7 5 N T R ) は、驚くべきほど多様な生物学的効果 (例えば、細胞死、シュヴァン細胞移動、シナプス伝達の調節、ならびに感覚ニューロンおよびカルシウム流動の機能的調節が挙げられる) を媒介する (例えば、非特許文献 1 を参照のこと)。近年の研究において、 p 7 5 N T R は、軸索伸長の調節にも関連付けられている。神経成長因子 ( N G F ) は、 N G F レセプターに関して p 7 5 N T R のみを発現する胚性ラット海馬ニューロンおよびヒヨコ毛様体ニューロンからの神経突起伸展を刺激する (例えば、非特許文献 2 を参照のこと)。これらの効果は、 p 7 5 N T R による R h o 活性の調節の説明となり得る。 R h o は、アクチン重合化の状態を調節する低分子 G T P a s e である。その活性な G T P 結合形態において、 R h o は、アクチン細胞骨格を堅くし、それによって、軸索伸長を阻害し、そして成長円錐の崩壊を媒介する (例えば、非特許文献 3 および 4 を参照のこと)。 p 7 5 N T R へのニューロトロフィン結合は、 H N 1 0 e 細胞および小脳ニューロンにおいて R h o A を不活性化し、一方、トランスフェクト 2 9 3 細胞における R h o A の過剰発現は、 R h o A の活性化をもたらし、このことは、 p 7 5 N T R が双方向性のシグナルを誘発

することを示唆する（例えば、非特許文献2を参照のこと）。実際、その後の研究によって、ミエリン由来の糖タンパク質であるミエリン結合糖タンパク質（MAG）が、p75<sup>NTR</sup>依存性機構でRhoAを活性化し、ゆえに、生後感覚ニューロンおよび小脳ニューロンのからの神経突起伸展を阻害することが示されている（例えば、非特許文献5を参照のこと）。さらに、Nogoおよび稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質（OMgp）、神経突起伸展の他のミエリン由来インヒビターは、p75<sup>NTR</sup>を介してニューロンに作用する（例えば、非特許文献6を参照のこと）。Nogoレセプターと複合体化したp75<sup>NTR</sup>は、現在までに見出されている全ミエリン由来インヒビターに対するレセプターを形成することが示唆されている（例えば、非特許文献6および7を参照のこと）。しかし、p75<sup>NTR</sup>によるRho活性の調節の正確な機構は、解明されるべきままの状態にある。

### 【0003】

RhoAは、酵母ツーハイブリッドシステムおよび同時免疫沈降によってp75<sup>NTR</sup>と相互作用することが示されている（例えば、非特許文献2を参照のこと）。野生型RhoA（これは、優先的にGDP結合形態であるが、RhoAの構成性活性形態ではない）のみがp75<sup>NTR</sup>と相互作用するので、RhoAの活性化が、RhoAおよびp75<sup>NTR</sup>の直接的な相互作用に依存することが示唆される。GDP結合形態のRhoタンパク質は、Rho GDP解離抑制タンパク質（Rho GDI）と相互作用する。このRho GDP解離抑制タンパク質は、ヌクレオチド解離の阻害ならびに細胞質と膜との間のRhoタンパク質の往復に役割をはたす（例えば、非特許文献8を参照のこと）。Rho GDIは、Rhoファミリーのタンパク質が、膜に転位する活性なGTP結合形態に変換されることを妨げる。さらに、Rhoタンパク質の活性形態が膜において不活性形態に変換された後、Rho GDIは、そのRhoタンパク質と複合体を形成し、そして細胞質ゾルに転位する。Rho GDIファミリーは、少なくとも3つのアイソフォーム：Rho GDI $\alpha$ 、Rho GDI $\beta$ 、およびRho GDI $\gamma$ を含む。Rho GDI $\alpha$ は、遍在的に発現し、これまで研究されているRhoファミリーのタンパク質の全てに結合し、一方、Rho GDI $\beta$ およ

び  $\text{Rh o G D I } \gamma$  は、特有の組織発現パターンを示し、そしてこれらの基質特異性は、正確に決定されていない。

【0004】

【非特許文献1】

Dechant, G. & Barde, Y. A., Nat Neurosci. 5, 1131-1136 (2002)

【非特許文献2】

Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A., Neuron 24, 585-593 (1999)

【非特許文献3】

Davies, A. M., Curr. Biol. 10, R198-200 (2000)

【非特許文献4】

Schmidt, A. & Hall, A., Genes Dev. 16, 1587-1609 (2002)

【非特許文献5】

Yamashita, T., Higuchi, H. & Tohyama, M., J. Cell Biol. 157, 565-570 (2002)

【非特許文献6】

Wang, K. C. & Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R. & He, Z., Nature 420, 74-78 (2002)

【非特許文献7】

Wong, S. T. et al., Nat Neurosci. 5, 1302-1308 (2002)

【非特許文献8】

Sasaki, T. & Takai, Y., Biochem Biophys Res Commun. 245, 641-645 (1998)

【0005】

**【発明が解決しようとする課題】**

以上にかんがみて、本発明は、神経突起伸展の阻害に関連する p 7 5 N T R とその相互作用因子との関係を明らかにすることによって、神経の再生を導き、さらにはその神経の再生に基づいて神経学的疾患を処置することを課題とする。

**【0006】****【課題を解決するための手段】**

上記課題は、一部、本発明者らが、p 7 5 を介したシグナル伝達経路の全容を解明したことに基づいて解決された。

**【0007】**

本発明者らは、p 7 5 N T R による R h o 活性の正確な調節機構を報告する。興味深いことに、p 7 5 N T R は、R h o G D I  $\alpha$  から R h o A の G D P 結合形態を外す活性を示す。p 7 5 N T R と特異的に会合することが示されたペプチドは、p 7 5 N T R によって媒介されるシグナルを効率的に阻害する。このペプチドは、ミエリン由来インヒビターによって誘発される成長阻害を反転させる際の有用な治療剤であり得る。

**【0008】**

ニューロトロフィンレセプター p 7 5 N T R は、ニューロトロフィンならびにいくつかのミエリン成分（ミエリン結合糖タンパク質、N o g o および稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質を含む）による軸索伸長の調節に関与する。ニューロトロフィンは、R h o 活性を阻害することによって神経突起伸展を刺激し、一方、ミエリン由来タンパク質は、R h o A を活性化し、これらの両方ともが、p 7 5 N T R 依存性機構を介する。ここで、本発明者らは、R h o G D P 解離抑制タンパク質と p 7 5 N T R との直接的な相互作用が、R h o A の活性化を開始することを示す。p 7 5 N T R と R h o G D I との相互作用は、ミエリン結合タンパク質または N o g o によって強化される。p 7 5 N T R は、R h o G D P 解離抑制タンパク質からのプレニル化 R h o A の離脱を促進する。p 7 5 N T R の 6 個の  $\alpha$ -ヘリックスのうちの 5 番目と会合することが示されたペプチドリガンドは、R h o G D P 解離抑制タンパク質と p 7 5 N T R との間の相互作用を阻害し、従って p 7 5 N T R によって媒介される作用をサイレンシングする

。このペプチドは、中枢神経系の再生欠如の一因となる阻害合図に対する治療剤としての可能性を有する。従って、p 7 5 N T R と R h o G D I との間の相互作用を破壊する因子は、中枢神経系の再生欠如の一因となる阻害合図に対する治療剤としての可能性、すなわち脊髄損傷、アルツハイマー病、脳梗塞、脳出血、脳外傷などの治療剤としての可能性を有する。

#### 【 0 0 0 9 】

従って、本発明は、以下を提供する。

#### 【 0 0 1 0 】

(1) 神経を再生するための組成物であって、P e p 5 ポリペプチドを含む、組成物。

#### 【 0 0 1 1 】

(2) 上記P e p 5 ポリペプチドは、

(a) 配列番号 1 に記載の核酸配列もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、項目 1 に記載の組成物。

#### 【 0 0 1 2 】

(3) 上記P e p 5 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列の全範囲を

含む、項目 1 に記載の組成物。

【0 0 1 3】

(4) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 1 に記載の組成物。

【0 0 1 4】

(5) 神経を再生するための組成物であって、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【0 0 1 5】

(6) 上記 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、項目 5 に記載の組成物。

【0 0 1 6】



(7) 上記 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 1 の核酸配列におけるヌクレオチド配列の全範囲を含む、項目 5 に記載の組成物。

【0 0 1 7】

(8) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 5 に記載の組成物。

【0 0 1 8】

(9) 神経を再生するための組成物であって、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【0 0 1 9】

(10) 上記 p 7 5 ポリペプチドは、

(a) 配列番号 3 または 1 6 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、項目 9 に記載の組成物。

【0 0 2 0】

(11) 上記 p 7 5 ポリペプチドは、配列番号 4 または 1 7 のアミノ酸配列のうち、それぞれ 2 7 3 位～4 2 7 位または 2 7 4 位～4 2 5 位の範囲を含む、

項目 9 に記載の組成物。

【 0 0 2 1 】

( 1 2 ) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 9 に記載の組成物。

【 0 0 2 2 】

( 1 3 ) 神経を再生するための組成物であって、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

【 0 0 2 3 】

( 1 4 ) 上記 P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子は、

( a ) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

( b ) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

( c ) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

( d ) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

( e ) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

( f ) ( a ) ～ ( e ) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

( g ) ( a ) ～ ( e ) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、項目 1 3 に記載の組成物。

## 【0024】

(15) 上記 p 75 ポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 3 または 16 の核酸配列において、それぞれヌクレオチド 1110 位～1283 位または 1113 位～1277 位の範囲を含む、項目 13 に記載の組成物。

## 【0025】

(16) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 13 に記載の組成物。

## 【0026】

(17) 神経を再生するための組成物であって、p 75 細胞外ドメインポリペプチドを含む、組成物。

## 【0027】

(18) 上記 p 75 細胞外ドメインは、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の核酸配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体の配列によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対

する同一性が少なくとも 70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、項目 17 に記載の組成物。

【0028】

(19) 上記 p 75 細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号 4 または 17 のアミノ酸、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位の範囲を含む、項目 17 に記載の組成物。

【0029】

(20) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 17 に記載の組成物。

【0030】

(21) 上記 p 75 細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、項目 17 に記載の組成物。

【0031】

(22) 神経を再生するための組成物であって、p 75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む、組成物。

【0032】

(23) 上記 p 75 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 1 9 8 位～8 6 3 位または 2 0 1 位～8 6 6 位のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 4 または 1 7 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 2 9 位～2 5 0 位または 3 0 位～2 5 1 位からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、項目 2 2 に記載の組成物。

#### 【 0 0 3 3 】

(2 4) 上記 p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号 3 または 1 6 の核酸配列において、それぞれヌクレオチド 1 9 8 位～8 6 3 位または 2 0 1 位～8 6 6 位の範囲を含む、項目 2 2 に記載の組成物。

#### 【 0 0 3 4 】

(2 5) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 2 2 に記載の組成物。

#### 【 0 0 3 5 】

(2 6) 上記 p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性である、項目 2 2 に記載の組成物。

#### 【 0 0 3 6 】

(2 7) 神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

#### 【 0 0 3 7 】

(2 8) 上記 R h o G D I ポリペプチドは、

(a) 配列番号 5 に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、  
を含む、項目 2 7 に記載の組成物。

#### 【0 0 3 8】

(2 9) 上記 R h o G D I ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸の全範囲を含む、項目 2 7 に記載の組成物。

#### 【0 0 3 9】

(3 0) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 2 7 に記載の組成物。

#### 【0 0 4 0】

(3 1) 神経を再生するための組成物であって、R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物。

#### 【0 0 4 1】

(3 2) 上記 R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、

(a) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドまたはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 5 に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ～ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む、項目 3 1 に記載の組成物。

#### 【0 0 4 2】

(3 3) 上記 R h o G D I は、配列番号 5 の全範囲を含む、項目 3 1 に記載の組成物。

#### 【0 0 4 3】

(3 4) 上記神経は、脊髄損傷、脳血管障害または脳外傷を含む状態にある、項目 3 1 に記載の組成物。

#### 【0 0 4 4】

(3 5) 上記神経の再生が、神経突起伸展の阻害を破壊することによるものである、項目 1、5、9、1 3、1 7、2 2、2 7 または 3 1 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

#### 【0 0 4 5】

(36) 神経を再生するための方法であって、

再生に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を上記神経に与える工程、

を包含する、方法。

【0046】

(37) 上記神経の再生は、神経突起伸展の阻害を破壊することによる、項目 36 に記載の方法。

【0047】

(38) 神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための組成物であって、

診断、予防、処置または予後に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む、組成物。

【0048】

(39) 神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法であって、

診断、予防、処置または予後に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペ



プチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を上記神経に与える工程、  
を包含する、方法。

#### 【0049】

(40) 神経細胞のネットワークの構築のための組成物であって、  
P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む、組成物。

#### 【0050】

(41) 神経細胞のネットワークの構築のための方法であって、  
ネットワークの構築に有効な量のP e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む組成物を上記神経細胞に与える工程、  
を包含する、方法。

#### 【0051】

(42) 神経学的疾患を処置するためのキットであって、  
(A) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分

子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物によって再生された細胞集団、

(B) 上記細胞集団を保存するための容器  
を包含する、キット。

【0 0 5 2】

(4 3) 神経学的疾患を処置するための方法であって、上記方法は、以下：

(a) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物によって再生された細胞集団を提供する工程；および

(b) 上記細胞集団を上記患者に移植する工程、  
を包含する、方法。

【0 0 5 3】

(4 4) 神経再生を誘導する因子を同定するためのスクリーニング方法であって、上記方法は、以下：

(a) 配列番号 4 または 1 7 に少なくとも 7 0 % 相同性であるアミノ酸配列を有する第 1 のポリペプチドまたはそのフラグメントおよび配列番号 6 に少なくとも 7 0 % 相同性であるアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチドまたはそのフラグメントを、試験因子の存在下で接触させる工程、および

(b) 上記第 1 のポリペプチドと上記第 2 のポリペプチドとの間の結合レベルを、上記試験因子の非存在下における結合レベルと比較する工程、  
を包含し、

ここで、上記試験因子の非存在下と比較して、試験因子の存在下において結合が減少した場合、上記試験因子は、神経を再生するための因子として同定される、方法。

【0 0 5 4】

(45) 項目44に記載の方法によって同定される、調節因子。

【0055】

(46) 項目45に記載の調節因子を含む、薬学的組成物。

【0056】

(47) 神経学的疾患、障害または状態を、予防または処置する方法であって、上記方法は、項目46に記載の薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【0057】

(48) P e p 5ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5ポリペプチドをコードする核酸分子およびR h o G D Iポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子の配列において野生型とは異なる配列が導入された配列を有する核酸分子を含む、ベクター。

【0058】

(49) 項目48に記載のベクターを含む、細胞。

【0059】

(50) 項目48に記載のベクターを含む、組織。

【0060】

(51) 項目48に記載のベクターを含む、臓器。

【0061】

(52) 項目48に記載のベクターを含む、生物。

【0062】

(53) 項目48に記載のベクターで形質転換された、神経改変トランスジェニック動物。

【0063】

(54) P e p 5ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5ポリペプチドをコードする核酸分子およびR h o G D Iポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される核酸分子が欠失された、神経改変ノックアウト動物。

【0064】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

#### 【0065】

(定義)

本明細書において「p 7 5 シグナル伝達経路」とは、ミエリン由来タンパク質が神経膜の p 7 5 受容体を介して R h o を活性化し、神経突起の伸展を阻害するにいたる一連のシグナル伝達経路をいい、すなわち、中枢神経の軸索がいったん損傷を受けたらもはや再生しない現象をもたらすメカニズムをいう。p 7 5 シグナル伝達経路は、図 6 を参照して説明すると、ミエリン由来タンパク質が p 7 5 に作用すると、p 7 5 を介して R h o が活性化され、神経の突起伸展を阻害する経路である。

#### 【0066】

本明細書において「P e p 5」とは、p 7 5 の細胞内ドメインに結合することにより、p 7 5 による R h o の活性化を阻害するペプチドをいう。P e p 5 は、代表的に、配列番号 1 (縮重核酸配列) および配列番号 2 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、P e p 5 の定義内に含まれる。P e p 5 の生物学的活性としては、例えば、ミエリン由来タンパク質による神経突起伸展阻害のブロックが挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、ミエリン由来タンパク質の R h o 活性化のブロックのような R h o の活性アッセイで測定することができる。

#### 【0067】

本明細書において「p 7 5 N T R」とは、ニューロトロフィンレセプターであり、ニューロトロフィンならびにいくつかのミエリン成分 (ミエリン結合糖タンパク質、N o g o および稀突起神経膠細胞ミエリン糖タンパク質を含む) による軸索伸長の調節に関与する。ニューロトロフィンレセプター (p 7 5 N T R) は、驚くべきほど多様な生物学的効果 (例えば、細胞死、シュヴァン細胞移動、シナプス伝達の調節、ならびに感覚ニューロンおよびカルシウム流動の機能的調節

が挙げられる)を媒介する(例えば、非特許文献1を参照のこと)。近年の研究において、p 7 5 N T R は、軸索伸長の調節にも関連付けられている。

#### 【0 0 6 8】

本明細書において「p 7 5」は、p 7 5 N T R と本明細書において互換可能に用いられ、ニューロトロフィンをリガンドとし、また、ミエリン由来タンパク質のシグナル伝達を介する、一回膜貫通型受容体をいう。p 7 5 は、代表的に、配列番号3または1 6 (核酸配列、それぞれヒトまたはラット) および配列番号4または1 7 (アミノ酸配列、それぞれヒトまたはラット) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、p 7 5 の定義内に含まれる。p 7 5 の生物学的活性としては、例えば、ニューロトロフィンによる神経突起伸展の促進が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、ニューロトロフィンによる R h o の活性阻害のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0 0 6 9】

本明細書において「p 7 5 細胞外ドメイン」とは、細胞膜上に一回膜貫通型受容体として存在している p 7 5 のアミノ末端で細胞外にある部分をいう。p 7 5 細胞外ドメインは、代表的に、配列番号3 (核酸配列、ヒト) の1 1 1 0 位～1 2 8 3 位または配列番号1 6 (核酸配列、ラット) の1 1 1 3 位～1 2 7 7 位および配列番号4 (アミノ酸配列、ヒト) の2 7 3 位～4 2 7 位、または配列番号1 7 (アミノ酸配列、ラット) の2 7 4 位～4 2 5 位に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、p 7 5 細胞外ドメインの定義内に含まれる。p 7 5 細胞外ドメインの生物学的活性としては、例えば、ミエリン由来タンパク質による神経突起伸展阻害のブロックが挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、ミエリン由来タンパク質による R h o の活性化のブロックのようなアッセイで測定することができる。

#### 【0 0 7 0】

用語「R h o G D P 解離抑制タンパク質」または「R h o G D I」は、交換可能に使用され、ヌクレオチド解離の阻害ならびに細胞質と膜との間の R h o タンパク質の往復に役割をはたすタンパク質である(例えば、非特許文献8を参

照のこと)。R h o G D I は、R h o ファミリーのタンパク質が、膜に転位する活性な G T P 結合形態に変換されることを妨げる。さらに、R h o タンパク質の活性形態が膜において不活性形態に変換された後、R h o G D I は、その R h o タンパク質と複合体を形成し、そして細胞質ゾルに転位する。R h o G D I ファミリーは、少なくとも 3 つのアイソフォーム：R h o G D I  $\alpha$ 、R h o G D I  $\beta$ 、および R h o G D I  $\gamma$  を含む。R h o G D I  $\alpha$  は、遍在的に発現し、これまで研究されている R h o ファミリーのタンパク質の全てに結合し、一方、R h o G D I  $\beta$  および R h o G D I  $\gamma$  は、特有の組織発現パターンを示す。R h o G D I は、代表的に、配列番号 5 (核酸配列) および配列番号 6 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、R h o G D I の定義内に含まれる。R h o G D I の生物学的活性としては、例えば、G D P 結合型 R h o との結合が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、G D P - G T P E x c h a n g e A s s a y のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0071】

本明細書において「MAG」とは、m y e l i n - a s s o c i a t e d g l y c o p r o t e i n の略であり、オリゴデンドロサイト・シュワン細胞の膜上に存在する糖タンパク質をさす。MAG は、代表的に、配列番号 7 (核酸配列) および配列番号 8 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、MAG の定義内に含まれる。MAG の生物学的活性としては、例えば、神経突起伸展阻害が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、神経細胞において R h o を活性化することを確認めるようなアッセイで測定することができる。

#### 【0072】

本明細書において「N o g o」とは、オリゴデンドロサイトの細胞膜上に存在する、2 回膜貫通型タンパク質をいう。N o g o は、代表的に、配列番号 9 (核酸配列) および配列番号 10 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、N o g o の定義内に含まれる。N o g o の生物学的活性としては、例えば、神経細胞の突起伸展阻害が挙

げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、神経細胞の R h o の活性化を見るアッセイなどで測定することができる。

#### 【0073】

用語「R h o」とは、アクチン重合化の状態を調節する低分子 G T P a s e である。その活性な G T P 結合形態において、R h o は、アクチン細胞骨格を堅くし、それによって、軸索伸長を阻害し、そして成長円錐の崩壊を媒介する（例えば、非特許文献 3 および 4 を参照のこと）。R h o は、代表的に、以下に説明する R h o A の配列である、配列番号 11（核酸配列）および配列番号 12（アミノ酸配列）に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、R h o の定義内に含まれる。R h o の生物学的活性としては、例えば、神経突起の伸展制御が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、エフェクタータンパク質を用いた A f f i n i t y P r e c i p i t a t i o n（親和性沈降）のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0074】

本明細書において「R h o A」とは、R h o ファミリーのメンバーである分子であり、代表的に、配列番号 11（核酸配列）および配列番号 12（アミノ酸配列）に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、R h o A の定義内に含まれる。R h o A の生物学的活性としては、例えば、神経突起の伸展制御が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、エフェクタータンパク質を用いた親和性沈降のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0075】

本明細書において「G T 1 b」とは、ガングリオシドの一種である分子であり、当該分野において定義されるのと同じ意味で用いられる。G T 1 b の生物学的活性としては、例えば、p 7 5 への結合が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、p 7 5 への結合実験のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0076】

本明細書において「p 2 1」とは、サイクリン依存性タンパク質キナーゼイン

ヒビター (cyclin-dependent protein kinase inhibitor) の一分子であり、別名 WAF1 または Cip1 と呼ばれる。p21 は、代表的に、配列番号 13 (核酸配列) および配列番号 14 (アミノ酸配列) に示す配列を有し、その改変体およびフラグメントもまた、生物学的活性を有する限り、p21 の定義内に含まれる。p21 の生物学的活性としては、例えば、細胞サイクルの停止が挙げられるがそれらに限定されず、そのような活性は、神経細胞の分子誘導のようなアッセイで測定することができる。

#### 【0077】

用語「サイレンシング」または「サイレンシングする」は交換可能に使用され、p75<sup>NTR</sup> と Rho GDI との間の相互作用を破壊することをいう。「サイレンサ」は、p75<sup>NTR</sup> と Rho GDI との間の相互作用を破壊する因子のことをいう。

#### 【0078】

(用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

#### 【0079】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変 (例えば、標識成分との結合体化)。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の 1 または 2 以上のアナログを含むポリペプチド (例えば、非天然のアミノ酸などを含む)、ペプチド様化合物 (例えば、ペプチド) および当該分野において公知の他の改変が包含される。本発明の遺伝子産物は、通常ポリペプチド形態をとる。このようなポリペプチ



ド形態の本発明の遺伝子産物は、本発明の診断、予防、治療または予後のための組成物として有用である。

### 【0080】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2' - O - メチル - リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N 3' - P 5' ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C - 5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン ( p h e n o x a z i n e - m o d i f i e d c y t o s i n e ) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA 中のリボースが 2' - O - プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1 またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの 3 番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列

を作成することにより達成され得る (B a t z e r ら、N u c l e i c A c i d R e s . 19:5081 (1991) ; O h t s u k a ら、J . B i o l . C h e m . 260:2605-2608 (1985) ; R o s s o l i n i ら、M o l . C e l l . P r o b e s 8:91-98 (1994) ) 。本発明の遺伝子は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。このようなポリヌクレオチド形態の本発明の遺伝子または遺伝子産物は、本発明の診断、予防、治療または予後のための組成物として有用である。

#### 【0081】

本明細書では「核酸分子」もまた、核酸、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドと互換可能に使用され、cDNA、mRNA、ゲノムDNAなどを含む。本明細書では、核酸および核酸分子は、用語「遺伝子」の概念に含まれ得る。ある遺伝子配列をコードする核酸分子はまた、「スプライス変異体 (改変体)」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を包含する。その名が示唆するように「スプライス変異体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる (別の) 核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物 (組換え形態のスプライス産物を含む) がこの定義に含まれる。したがって、本明細書では、たとえば、本発明の遺伝子には、そのスプライス変異体もまた包含され得る。

#### 【0082】

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子 (たとえば、プロモーター) という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。したがって、P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1 遺伝子というときは、通常、本発明の遺伝子の構造遺伝子ならびにそ

のプロモーターなどの転写および／または翻訳の調節配列の両方を包含する。本発明では、構造遺伝子のほか、転写および／または翻訳などの調節配列もまた、神経再生、神経疾患の診断、治療、予防、予後などに有用であることが理解される。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」ならびに／または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

### 【 0 0 8 3 】

本明細書において遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2 以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。また、本明細書において配列（核酸配列、アミノ酸配列など）の同一性とは、2 以上の対比可能な配列の、互いに対する同一の配列（個々の核酸、アミノ酸など）の程度をいう。従って、ある 2 つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2 種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2 つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間で DNA 配列が、代表的には少なくとも 5 0 % 同一である場合、好ましくは少なくとも 7 0 % 同一である場合、より好ましくは少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2 以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて相同性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、相同性と類似性とは同じ数値を示す。

## 【0084】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて算出される。

## 【0085】

本明細書において、「アミノ酸」は、本発明の目的を満たす限り、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および／または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

## 【0086】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによ

り推奨される 1 文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された 1 文字コードにより言及され得る。

#### 【0087】

本明細書において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

#### 【0088】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。したがって、マウスの *Pe p 5*、*p 7 5*、*R h o G D I*、*M A G*、*p 2 1* の遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物（ヒト、ラット、ブタ、ウシなど）においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、マウスの *Pe p 5*、*p 7 5*、*R h o G D I*、*M A G*、*p 2 1* の遺伝子）の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えばヒト、ラット）の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

#### 【0089】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログ

の例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-Ο-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸 (PNA) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0090】

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド (長さが  $n$ ) に対して、 $1 \sim n-1$  までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50 およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ (例えば、11 など) もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100 およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ (例えば、11 など) もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個 (または例えば上下 10%) のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本明細書において有用なフラグメントの長さは、そのフラグメントの基準となる全長タンパク質の機能のうち少なくとも 1 つの機能が保持されているかどうかによって決定され得る。

#### 【0091】

本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの生物学的因子に対して「特異的に相互作用する因子」とは、そのポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドなどの生物学的因子に対する親和性が、他の無関連の (特に、同一性が 30% 未満の) ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する親和性よりも、

代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に（例えば、統計学的に有意に）高いものをいう。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。本明細書において「因子」としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を（例えば、70%以上の配列同一性）もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物（例えば、単鎖抗体）、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0092】

本明細書において「有機低分子」とは、有機分子であって、比較的分子量が小さなものをいう。通常有機低分子は、分子量が約1000以下のものをいうが、それ以上のものであってもよい。有機低分子は、通常当該分野において公知の方法を用いるかそれらを組み合わせて合成することができる。そのような有機低分子は、生物に生産させてもよい。有機低分子としては、例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）などが挙

げられるがそれらに限定されない。

#### 【0093】

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF (a b' ) 2 およびF a b 断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\alpha$  ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

#### 【0094】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびにF a b 分子、F (a b' ) 2 フラグメント、F v フラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術（例えば、K o h l e r およびM i l s t e i n, N a t u r e (1975) 256:495) またはその改変（例えば、B u c k ら (1982) I n V i t r o 18:377) を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現するB細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られたB細胞（すなわちすべての剥離した脾臓細胞）をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させる。

#### 【0095】



本明細書において「抗原」(a n t i g e n)とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(i m m u n o g e n)とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

#### 【0096】

本明細書において「単鎖抗体」とは、F<sub>v</sub>領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じたものをいう。

#### 【0097】

本明細書において「複合分子」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子をいう。そのような複合分子としては、例えば、糖脂質、糖ペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1の遺伝子またはその産物あるいはG T 1 bまたは本発明の因子と同様の機能を有する限り、それぞれP e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1の遺伝子またはその産物あるいはG T 1 bまたは本発明の因子としてそのような複合分子も使用することができる。

#### 【0098】

本明細書において「単離された」生物学的因子(例えば、核酸またはタンパク質など)とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子(例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など)から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

#### 【0099】

本明細書において「精製された」生物学的因子(例えば、核酸またはタンパク

質など)とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い(すなわち濃縮されている)。

#### 【0100】

本明細書中で使用される用語「精製された」および「単離された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。

#### 【0101】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

#### 【0102】

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチド(例えば、Pep5、p75、Rho GDI、MAG、p21)の発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「増加」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチド(例えば、Pep5、p75、Rho GDI、MAG、p21)の発現量の増加を含む。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見ら

れていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。このような遺伝子または遺伝子産物（ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）の発現の増加または減少は、本発明の治療形態、予後形態または予防形態において有用であり得る。

### 【0103】

本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、植物の特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位（特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。したがって、本発明において、ある実施形態では、罹患した箇所（例えば、神経）に局所的に P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1 を特異的に発現させてもよい。

### 【0104】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、2つの因子が相互作用する（例えば、P e p 5 と p 7 5、p 7 5 と R h o G D I、M A G と p 7 5、G T 1 b と p 7 5 とが結合する）場合、その生物学的活性は、その二分子との間の結合およびそれによって生じる生物学的変化、例えば、一つの分子を抗体を用いて沈降させたときに他の分子も共沈するとき、2分子は結合していると考えられる。したがって、そのような共沈を見ることが一つの判断手法として挙げられる。また、神経突起の伸展を指標にしてある分子と他の分子とが機能的に関連していると関連付けることができる。具体的には、M A G、G T 1 b、p 7 5、R h o G D I は相互に関連して神経突起の伸展を阻害するが、P e p 5 および p 2 1 は、その作用をブロックすることを確認することなどを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

## 【0 1 0 5】

本明細書において「アンチセンス（活性）」とは、標的遺伝子の発現を特異的に抑制または低減することができる活性をいう。アンチセンス活性は、通常、目的とする遺伝子（例えば、P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1 など）の核酸配列と相補的な、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長の核酸配列によって達成される。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも 9 の連続するヌクレオチド長の、より好ましく 1 0 の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは 1 1 の連続するヌクレオチド長の、1 2 の連続するヌクレオチド長の、1 3 の連続するヌクレオチド長の、1 4 の連続するヌクレオチド長の、1 5 の連続するヌクレオチド長の、2 0 の連続するヌクレオチド長の、2 5 の連続するヌクレオチド長の、3 0 の連続するヌクレオチド長の、4 0 の連続するヌクレオチド長の、5 0 の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。そのような核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも 7 0 % 相同な、より好ましくは、少なくとも 8 0 % 相同な、さらに好ましくは、9 0 % 相同な、もっとも好ましくは 9 5 % 相同な核酸配列が含まれる。そのようなアンチセンス活性は、目的とする遺伝子の核酸配列の 5' 末端の配列に対して相補的であることが好ましい。そのようなアンチセンスの核酸配列には、上述の配列に対して、1 つまたは数個あるいは 1 つ以上のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を有するものもまた含まれる。

## 【0 1 0 6】

本明細書において「RNA i」とは、RNA i n t e r f e r e n c e の略称で、二本鎖 RNA（d s RNA ともいう）のような RNA i を引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同な mRNA が特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書において RNA i はまた、場合によっては、RNA i を引き起こす因子と同義に用いられ得る。

## 【0 1 0 7】

本明細書において「RNA i を引き起こす因子」とは、RNA i を引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「

RNA i を引き起こす因子」とは、その遺伝子に関する RNA i を引き起こし、RNA i がもたらす効果（例えば、その遺伝子の発現抑制など）が達成されることをいう。そのような RNA i を引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約 70% の相同性を有する配列またはストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも 10 ヌクレオチド長の二本鎖部分を含む RNA またはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3' 突出末端を含み、より好ましくは、3' 突出末端は、2 ヌクレオチド長以上の DNA（例えば、2～4 ヌクレオチド長の DNA）であり得る。

#### 【0108】

本明細書において、「ストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 M の NaCl 存在下、65℃ でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2 倍濃度の SSC (saline-sodium citrate) 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムである）を用い、65℃ 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A 配列のみまたは T 配列のみを含む配列が除外される。「ハイブ

「リダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

#### 【0109】

本明細書において「高度にストリンジェントな条件」は、核酸配列において高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そしてミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、65～68℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミド、42℃である。このような高度にストリンジェントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N. Y. 1989)；およびAnderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach、IV、IRL Press Limited (Oxford, England). Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤）を、使用してもよい。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤

の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (NaDodSO<sub>4</sub> または SDS)、Ficoll、Denhardt 溶液、超音波処理されたサケ精子 DNA (または別の非相補的 DNA) および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8~7.4 で実施されるが；代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんど pH 独立である。Anderson et al.、Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England) を参照のこと。

#### 【0110】

DNA 二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性の DNA がハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致した DNA 二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、N は、形成される二重鎖の長さであり、[Na<sup>+</sup>] は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+C は、ハイブリッド中の (グアニン+シトシン) 塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各 1% 不一致 (ミスマッチ) に対して約 1℃ ずつ減少する。

#### 【0111】

本明細書において「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有する DNA 二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件

」の例は、0.015M塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、50～65℃、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37～50℃である。例として、0.015Mナトリウムイオン中、50℃の「中程度にストリンジェントな」条件は、約21%の不一致を許容する。

#### 【0112】

本明細書において「高度」にストリンジェントな条件と「中程度」にストリンジェントな条件との間に完全な区別は存在しないことがあり得ることが、当業者によって理解される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71℃である。65℃（同じイオン強度）での洗浄において、これは、約6%不一致を許容にする。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。

#### 【0113】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1MNaClにおける融解温度の適切な概算は、

$$T_m = (1 \text{つのA-T塩基につき } 2^\circ\text{C}) + (1 \text{つのG-C塩基対につき } 4^\circ\text{C})$$
によって提供される。なお、6×クエン酸ナトリウム塩（SSC）におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである（Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683頁、BrownおよびFox（編）（1981）を参照のこと）。

#### 【0114】

Pep5、p75、Rho GDI、MAG、p21のタンパク質をコードする天然の核酸は、例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15または17などの核酸配列の一部を含むPCRプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを有するcDNAライブラリーから容易に分離される。好ましいPep5、p75、Rho GDI、MAG、p21の核酸は、本質的に1%ウシ血清アルブミン（BSA）；500mM リン酸ナトリウム（NaPO<sub>4</sub>）；1mM EDTA；42℃の温度で 7% SDS を含むハイブリダイゼーショ



ン緩衝液、および本質的に  $2\times\text{SSC}$  ( $600\text{ mM NaCl}$ ;  $60\text{ mM}$  クエン酸ナトリウム);  $50^\circ\text{C}$  の  $0.1\%$  SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、さらに好ましくは本質的に  $50^\circ\text{C}$  の温度での  $1\%$  ウシ血清アルブミン (BSA);  $500\text{ mM}$  リン酸ナトリウム ( $\text{NaPO}_4$ );  $15\%$  ホルムアミド;  $1\text{ mM}$  EDTA;  $7\%$  SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に  $50^\circ\text{C}$  の  $1\times\text{SSC}$  ( $300\text{ mM NaCl}$ ;  $30\text{ mM}$  クエン酸ナトリウム);  $1\%$  SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、最も好ましくは本質的に  $50^\circ\text{C}$  の温度での  $1\%$  ウシ血清アルブミン (BSA);  $200\text{ mM}$  リン酸ナトリウム ( $\text{NaPO}_4$ );  $15\%$  ホルムアミド;  $1\text{ mM}$  EDTA;  $7\%$  SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に  $65^\circ\text{C}$  の  $0.5\times\text{SSC}$  ( $150\text{ mM NaCl}$ ;  $15\text{ mM}$  クエン酸ナトリウム);  $0.1\%$  SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下に配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15 または 17 に示す配列の 1 つまたはその一部とハイブリダイズし得る。

#### 【0115】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

#### 【0116】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも 9 の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは 10 の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは 11 の連続するヌクレオチド長の、12 の連続するヌクレオチド長の、13 の連続するヌクレオチド長の、14 の連続するヌクレオチド長の、15 の連続するヌクレオチド長の、20 の連続するヌクレオチド長の、25 の連続するヌクレオチド長の、30 の連続するヌクレオチド長の、40 の連続するヌ

クレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。

#### 【0117】

本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448 (1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981))、およびNeedleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ (マイクロアレイアッセイ)、PCRおよびin situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明において使用されるPep5、p75、Rho GDI、MAG、p21には、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

#### 【0118】

本明細書において配列 (アミノ酸または核酸など) の「同一性」、「相同性」および「類似性」のパーセンテージは、比較ウィンドウで最適な状態に整列された配列2つを比較することによって求められる。ここで、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の比較ウィンドウ内の部分には、2つの配列の最適なアライメントについての基準配列 (他の配列に付加が含まれていればギャップが生

じることもあるが、ここでの基準配列は付加も欠失もないものとする)と比較したときに、付加または欠失(すなわちギャップ)が含まれる場合がある。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基がどちらの配列にも認められる位置の数を求めることによって、マッチ位置の数を求め、マッチ位置の数を比較ウィンドウ内の総位置数で割り、得られた結果に100を掛けて同一性のパーセンテージを算出する。検索において使用される場合、相同性については、従来技術において周知のさまざまな配列比較アルゴリズムおよびプログラムの中から、適当なものを用いて評価する。このようなアルゴリズムおよびプログラムとしては、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALW (Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (8): 2444-2448、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410、Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22 (2): 4673-4680、Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266: 383-402、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410、Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3: 266-272) があげられるが、何らこれに限定されるものではない。特に好ましい実施形態では、従来技術において周知のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) (たとえば、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2267-2268、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410、Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3: 266-272、Altschul et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402を参照のこと)を用いてタンパク質および核酸配列の相同性を評価する。特に、5つの専用BLASTプログラムを用いて以下の作業を実施することによって比較または検索が達成され得る。

【0119】

- (1) BLASTPおよびBLAST3でアミノ酸のクエリー配列をタンパク質配列データベースと比較;
- (2) BLASTNでヌクレオチドのクエリー配列をヌクレオチド配列データベースと比較;
- (3) BLASTXでヌクレオチドのクエリー配列(両方の鎖)を6つの読み枠で変換した概念的翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較;
- (4) TBLASTNでタンパク質のクエリー配列を6つの読み枠(両方の鎖)すべてで変換したヌクレオチド配列データベースと比較;
- (5) TBLASTXでヌクレオチドのクエリー配列を6つの読み枠で変換したものを、6つの読み枠で変換したヌクレオチド配列データベースと比較。

#### 【0120】

BLASTプログラムは、アミノ酸のクエリー配列または核酸のクエリー配列と、好ましくはタンパク質配列データベースまたは核酸配列データベースから得られた被検配列との間で、「ハイスコアセグメント対」と呼ばれる類似のセグメントを特定することによって相同配列を同定するものである。ハイスコアセグメント対は、多くのものが従来技術において周知のスコアリングマトリックスによって同定(すなわち整列化)されると好ましい。好ましくは、スコアリングマトリックスとしてBLOSUM62マトリックス(Gonnet et al., 1992, Science 256:1443-1445、Henikoff and Henikoff, 1993, Proteins 17:49-61)を使用する。このマトリックスほど好ましいものではないが、PAMまたはPAM250マトリックスも使用できる(たとえば、Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundationを参照のこと)。BLASTプログラムは、同定されたすべてのハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価し、好ましくはユーザー固有の相同率などのユーザーが独自に定める有意性の閾値レベルを満たすセグメン

トを選択する。統計的な有意性を求めるKarlinの式を用いてハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価すると好ましい(Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268参照のこと)。

#### 【0121】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子（例えば、DNAまたはRNAなど）が用いられ得る。

#### 【0122】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましく10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、16の連続するヌクレオチド長の、17の連続するヌクレオチド長の、18の連続するヌクレオチド長の、19の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASER GENE, Primer Select, DNASTar）を用いて行ってもよい。

## 【0 1 2 3】

本明細書において、「エピトープ」とは、構造の明らかな抗原決定基をいう。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および／もしくは主要組織適合性複合体（MHC）レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが包含される。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷）であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998（所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法）；米国特許第4,708,871号（抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順）；およびGeysenら（1986）Molecular Immunology 23:709（所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術）を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができ

る。

#### 【0 1 2 4】

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、より好ましくは5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。エピトープは線状であってもコンフォメーション形態であってもよい。

#### 【0 1 2 5】

(遺伝子の改変)

あるタンパク質分子（例えば、P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1 など）において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

#### 【0 1 2 6】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている（K y t e . J および D o o l i t t l e , R . F . J . M o l . B i o l . 1 5 7 ( 1 ) : 1 0 5 - 1 3 2 , 1 9 8 2）。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など）との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン（+

4. 5) ; バリン (+4. 2) ; ロイシン (+3. 8) ; フェニルアラニン (+2. 8) ; システイン/シスチン (+2. 5) ; メチオニン (+1. 9) ; アラニン (+1. 8) ; グリシン (-0. 4) ; スレオニン (-0. 7) ; セリン (-0. 8) ; トリプトファン (-0. 9) ; チロシン (-1. 3) ; プロリン (-1. 6) ; ヒスチジン (-3. 2) ; グルタミン酸 (-3. 5) ; グルタミン (-3. 5) ; アスパラギン酸 (-3. 5) ; アスパラギン (-3. 5) ; リジン (-3. 9) ; およびアルギニン (-4. 5) ) である。

#### 【0127】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0. 5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4, 554, 101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3. 0) ; リジン (+3. 0) ; アスパラギン酸 (+3. 0±1) ; グルタミン酸 (+3. 0±1) ; セリン (+0. 3) ; アスパラギン (+0. 2) ; グルタミン (+0. 2) ; グリシン (0) ; スレオニン (-0. 4) ; プロリン (-0. 5±1) ; アラニン (-0. 5) ; ヒスチジン (-0. 5) ; システイン (-1. 0) ; メチオニン (-1. 3) ; バリン (-1. 5) ; ロイシン (-1. 8) ; イソロイシン (-1. 8) ; チロシン (-2. 3) ; フェニルアラニン (-2. 5) ; およびトリプトファン (-3. 4) 。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0. 5以内であることがさらに好ましい。

#### 【0128】

本明細書において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ



酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、 $\pm 2$  以内のもの同士、好ましくは $\pm 1$  以内のもの同士、より好ましくは $\pm 0.5$  以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

### 【0 1 2 9】

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。そのような改変体としては、基準となる核酸分子またはポリペプチドに対して、1 または数個の置換、付加および／または欠失、あるいは1 つ以上の置換、付加および／または欠失を含むものが挙げられるがそれらに限定されない。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ (homolog)」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性 (好ましくは、60 % 以上の相同性、より好ましくは、80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、95 % 以上の相同性) を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ (ortholog)」とは、オルソログ遺伝子 (orthologous gene) ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスの  $\alpha$  ヘモグロビン遺伝子はオルソログであ

るが、ヒトの  $\alpha$  ヘモグロビン遺伝子および  $\beta$  ヘモグロビン遺伝子はパラログ（遺伝子重複で生じた遺伝子）である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用である。オルソログは、通常別の種において、もとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

### 【0 1 3 0】

本明細書において「保存的（に改変された）改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の 1 つの種である「サイレント改変（変異）」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン（通常メチオニンのための唯一のコドンである A U G、および通常トリプトファンのための唯一のコドンである T G G を除く）が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、DNA ポリメラーゼ、K l e n o w フラグメント、DNA リガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法（特定部位指向突然変異法；Mark Zoller and Michael Smith, Methods in Enzymology, 100, 468-500 (1983)

）が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うこともできる。

#### 【0131】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

#### 【0132】

本明細書において使用される用語「ペプチドアナログ」または「ペプチド誘導体」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のアミノ酸アナログまたはアミノ酸誘導体が付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能（例えば、 $pK_a$  値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど）と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、ペプチドアナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。

#### 【0133】

同様に、「ポリヌクレオチドアナログ」、「核酸アナログ」は、ポリヌクレオチドまたは核酸とは異なる化合物であるが、ポリヌクレオチドまたは核酸と少なくとも 1 つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ポリヌクレオチドアナログまたは核酸アナログには、もとのペプチドに対して、1 つ以上のヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体が付加または置換されているものが含まれる。

#### 【0 1 3 4】

本明細書において使用される核酸分子は、発現されるポリペプチドが天然型のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていてもよい。あるいは、5' 末端および／または 3' 末端に他の核酸が結合していてもよい。また、ポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような遺伝子は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

#### 【0 1 3 5】

このような核酸は、周知の P C R 法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

#### 【0 1 3 6】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1 つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのよう

な数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

【0137】

(一般技術)

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Gree

ne Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

#### 【0138】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

## 【0 1 3 9】

(遺伝子工学)

本発明において用いられる P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1 ならびにそのフラグメントおよび改変体は、遺伝子工学技術を用いて生産することができる。

## 【0 1 4 0】

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチプルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチプルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書に記載される文献（例えば、S a m b r o o k ら、前出）に記載されている。

## 【0 1 4 1】

本明細書において「発現ベクター」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

## 【0 1 4 2】

本発明において用いられ得る原核細胞に対する「組み換えベクター」としては、p c D N A 3 (+)、p B l u e s c r i p t - S K (+/-)、p G E M - T、p E F - B O S、p E G F P、p H A T、p U C 1 8、p F T - D E S T T

M42 GATEWAY (Invitrogen) などが例示される。

【0143】

本発明において用いられ得る動物細胞に対する「組み換えベクター」としては、p cDNA I/Amp、p cDNA I、p CDM8 (いずれもフナコシより市販)、p AGE107 [特開平3-229 (Invitrogen)、p AGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p AMo、p AMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)]、マウス幹細胞ウイルス (Murine Stem Cell Virus) (MSCV) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、p EF-BOSS、p EGFP などが例示される。

【0144】

本明細書において「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

【0145】

本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、通常RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。したがって、本明細書においてある遺伝子のプロモーターの働きを有する部分を「プロモーター部分」という。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2 kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2 kbp以内に存在する。

【0146】

本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるため



に用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

#### 【0147】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

#### 【0148】

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook J ら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual、2nd Ed. およびその第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

#### 【0149】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など(例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法など)が挙げられる。

## 【0150】

本明細書において「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細胞は、形質転換体であってもよい。

## 【0151】

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、*Escherichia* 属、*Serratia* 属、*Bacillus* 属、*Brevibacterium* 属、*Corynebacterium* 属、*Microbacterium* 属、*Pseudomonas* 属などに属する原核生物細胞、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1 が例示される。

## 【0152】

本明細書において使用される場合、動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、BHK 細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト結腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSO など、ラット・ミエローマ細胞としては YB2/0 など、ヒト胎児腎臓細胞としては HEK293（ATCC:CRL-1573）など、ヒト白血病細胞としては BALL-1 など、アフリカミドリザル腎臓細胞としては COS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としては HCT-15、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH、SK-N-SH-5Y、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A などが例示される。

## 【0153】

本明細書において使用される場合、組換えベクターの導入方法としては、DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、塩化カルシウム

法、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、リポフェクション法、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法などが例示される。

#### 【0154】

本明細書において、レトロウイルスの感染方法は、例えば、Current Protocols in Molecular Biology 前出 (特に Units 9.9-9.14) などに記載されるように、当該分野において周知であり、例えば、トリプシナイズして胚性幹細胞を単一細胞懸濁物 (single-cell suspension) にした後、ウイルス産生細胞 (virus-producing cells) (パッケージング細胞株=packaging cell lines) の培養上清と一緒に1~2時間共培養 (co-culture) することにより、十分量の感染細胞を得ることができる。

#### 【0155】

本明細書において使用されるゲノムまたは遺伝子座などを除去する方法において用いられる、Cre酵素の一過的発現、染色体上でのDNAマッピングなどは、細胞工学別冊実験プロトコルシリーズ「FISH実験プロトコル ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで」松原謙一、吉川 寛 監修 秀潤社 (東京) などに記載されるように、当該分野において周知である。

#### 【0156】

本明細書において遺伝子発現 (たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現) の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRI

A法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec ; 32 Suppl : 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

#### 【0157】

本明細書において「発現量」とは、対象となる細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

#### 【0158】

本明細書において「上流」という用語は、特定の基準点からポリヌクレオチドの5'末端に向かう位置を示す。

#### 【0159】

本明細書において「下流」という用語は、特定の基準点からポリヌクレオチドの3'末端に向かう位置を示す。

#### 【0160】

本明細書において「塩基対の」および「Watson & Crick塩基対の」という表現は、本明細書では同義に用いられ、二重らせん状のDNAにおいて見られるものと同様に、アデニン残基が2つの水素結合によってチミン残基またはウラシル残基と結合し、3つの水素結合によってシトシン残基とグアニン残基とが結合するという配列の正体に基づいて互いに水素結合可能なヌクレオチドを示す（S t r y e r, L., B i o c h e m i s t r y, 4 t h e d i t i o n, 1995を参照）。

#### 【0161】

本明細書において「相補的」または「相補体」という用語は、本明細書では、相補領域全体がそのまま別の特定のポリヌクレオチドとW a t s o n & C r i c k 塩基対を形成することのできるポリヌクレオチドの配列を示す。本発明の目的で、第1のポリヌクレオチドの各塩基がその相補塩基と対になっている場合に、この第1のポリヌクレオチドは第2のポリヌクレオチドと相補であるとみなす。相補塩基は一般に、AとT（あるいはAとU）、またはCとGである。本願明細書では、「相補」という語を「相補ポリヌクレオチド」、「相補核酸」および「相補ヌクレオチド配列」の同義語として使用する。これらの用語は、その配列のみに基づいてポリヌクレオチドの対に適用されるものであり、2つのポリヌクレオチドが事実上結合状態にある特定のセットに適用されるものではない。

#### 【0162】

（ポリペプチドの製造方法）

本発明のポリペプチド（例えば、P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1など）をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞などに由来する形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、本発明の培養物より本発明のポリペプチドを採取することにより、本発明に係るポリペプチドを製造することができる。

#### 【0163】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、本発明の生物が資化

し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

#### 【0164】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。

#### 【0165】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素物質、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

#### 【0166】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。

#### 【0167】

培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また培養中に必要に応じて、アンピシリンまたはテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0168】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、tr

p プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。遺伝子を導入した細胞または器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。

#### 【0169】

例えば、動物細胞を用いる場合、本発明の細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地(The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967))、EagleのMEM培地(Science, 122, 501 (1952))、DMEM培地(Virology, 8, 396 (1959))、199培地(Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950))またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

#### 【0170】

培養は、通常pH 6～8、25～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0171】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列で形質転換された形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離または精製するためには、当該分野で周知慣用の通常の酵素の単離または精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞外に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、その培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。その可溶性画分から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル(DEAE)－Sepharose、DIAION HPA-75(三菱化成)等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia)等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォー

カシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0172】

本発明のポリペプチド（例えば、Pep5、p75、Rho GDI、MAG、p21など）が本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、その細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモジナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。その無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈澱法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-Sephacrose、DIAION HPA-75（三菱化成）等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sephacrose FF（Pharmacia）等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用いることによって、精製標品を得ることができる。

#### 【0173】

本発明のポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈澱画分より、通常の方法により本発明のポリペプチドを回収後、そのポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。この可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、本発明のポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

#### 【0174】

また、通常のタンパク質の精製方法 [J. E. van. Sadlerら: Methods in Enzymology, 83, 458] に準じて精製できる。また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し



、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔山川彰夫，実験医学（Experimental Medicine），13，469-474（1995）〕。例えば、Loweらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227-8231（1989）、Genes Develop., 4, 1288（1990）〕に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

#### 【0175】

また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227（1989）、Genes Develop., 4, 1288（1990）〕。

#### 【0176】

さらに、本発明のポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。本発明のポリペプチドは、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129-134、Science, 242, 1162-1164、J. Biochem., 110, 166-168（1991）〕に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて生産することができる。

#### 【0177】

本発明のポリペプチドは、そアミノ酸情報を基に、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech、Applied Biosystems、Pharmacia Biotech、Protein Technology Instrument、Synthecell-Vega、PerSeptive、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

## 【0178】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。本発明の新規 p s 20 様ポリペプチドの生理活性は、公知の測定法 [Cell, 75, 1389 (1993)、J. Cell Bio. 1146, 233 (1999)、Cancer Res. 58, 1238 (1998)、Neuron 17, 1157 (1996)、Science 289, 1197 (2000)] に準じて測定することができる。

## 【0179】

（変異型ポリペプチドの作製方法）

本発明のポリペプチド（例えば、Pep5、p75、Rho GDI、MAG、p21など）のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加（融合を含む）は、周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができる。かかる1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO 85/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

## 【0180】

## (免疫化学)

本発明のポリペプチド（例えば、P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、p 2 1 など）を認識する抗体の作製もまた当該分野において周知である。例えば、ポリクローナル抗体の作製は、取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明のタンパク質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより行うことができる。

## 【0181】

抗体を生産する場合、投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。その抗原の投与量は動物 1 匹当たり 5 0 ～ 1 0 0  $\mu$  g が好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン（k e y h o l e l i m p e t h a e m o c y a n i n）またはウシチログロブリン等のキャリアタンパク質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。その抗原の投与は、1 回目の投与の後 1 ～ 2 週間おきに 3 ～ 1 0 回行う。各投与後、3 ～ 7 日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法（E L I S A 法）：医学書院刊 1 9 7 6 年、A n t i b o d i e s - A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y ( 1 9 8 8 ) 〕等で確認する。

## 【0182】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、その血清より、周知技術を用いてポリクローナル抗体を分離、精製することができる。モノクローナル抗体の作製もまた当該分野において周知である。抗体産性細胞の調製のために、まず、免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として使用し、骨髓腫細胞との融合により、ハイブリドーマの作製を行う。その後、酵素免疫測定法になどより、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。このようにして得たハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体は種々の目的に使用

することができる。

#### 【0183】

このような抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの免疫学的検出方法に使用することができ、本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるE L I S A法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等を挙げることができる。

#### 【0184】

また、本発明ポリペプチドの免疫学的定量方法にも使用することができる。本発明ポリペプチドの定量方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチE L I S A法、<sup>126</sup>I等の放射性同位体で標識した本発明のタンパク質と本発明のタンパク質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等を挙げることができる。

#### 【0185】

本発明ポリペプチドのm R N Aの定量方法もまた、当該分野において周知である。例えば、本発明のポリヌクレオチドあるいはD N Aより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはP C R法により、本発明のポリペプチドをコードするD N Aの発現量をm R N Aレベルで定量することができる。このような技術は、当該分野において周知であり、本明細書において列挙した文献にも記載されている。

#### 【0186】

当該分野で公知の任意の方法によって、これらのポリヌクレオチドが得られ得、そしてこれらポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、決定され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブルされ得（例えば、K u t m e i e rら、B i o T e c h n i q u e s 17:242（1994）に記載されるように）、これは、手短に言えば、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびに次いでP C Rによるこの連結されたオリゴ

ヌクレオチドの増幅を含む。

【0187】

抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源由来の核酸から作製することができる。ある抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体 cDNA ライブラリーまたは抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成された cDNA ライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリ A + RNA））から、例えば、抗体をコードする cDNA ライブラリーからの cDNA クローンを同定するために、その配列の 3' 末端および 5' 末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用する PCR 増幅によって、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得ることができる。PCR によって作製された増幅された核酸は、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

【0188】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換え DNA 技術、部位指向性変異誘発、PCR など（例えば、Sambrook ら、1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY および Ausubel ら編、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY に記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を生成するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し得る。

【0189】

特定の実施形態において、重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域（CDR）の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に）挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278:457-479（1998）を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

#### 【0190】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855（1984）；Neubergerら、Nature 312:604-608（1984）；Takedaら、Nature 314:452-454（1985））が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の

可変領域を有する（例えば、ヒト化抗体）。

#### 【0191】

単鎖抗体を製造する場合、単鎖抗体の産生に関する記載された公知の技術（米国特許第4,946,778号；Bird、Science 242:423-42（1988）；Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883（1988）；およびWardら、Nature 334:544-54（1989））が、利用され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る（Skerraら、Science 242:1038-1041（1988））。

#### 【0192】

（抗体を産生する方法）

本発明の抗体は、抗体の合成のために当該分野で公知の任意の方法によって、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

#### 【0193】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ（例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分（好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法としては、例

例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、PCT公開 WO 8 6 / 0 5 8 0 7 ; PCT公開 WO 8 9 / 0 1 0 3 6 ; および米国特許第 5 , 1 2 2 , 4 6 4 号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

#### 【0194】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、次いで、このトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

#### 【0195】

本発明の関連した局面において、薬学的組成物（例えば、ワクチン組成物）が、予防適用または治療適用のために提供される。このような組成物は、一般に、本発明の免疫原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび免疫刺激剤（例えば、アジュバント）を含む。

#### 【0196】

（スクリーニング）

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の因子（例えば、抗体）、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。スクリーニングは、イ



ンビトロ、インビボなど実在物質を用いた系を使用してもよく、インシリコ（コンピュータを用いた系）の系を用いて生成されたライブラリーを用いてもよい。本発明では、所望の活性を有するスクリーニングによって得られた化合物もまた、本発明の範囲内に包含されることが理解される。また本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

### 【0197】

（神経疾患および再生）

本明細書において「神経疾患」または「神経学的疾患」とは、本明細書において同義で用いられ、神経の機能、構造、器官などの断絶、停止、または障害をいい、通常、次の基準のうち少なくとも2つを満たす病変をいう：1）病因物質をもつこと；2）はっきりと指摘できる徴候および／または症候群があること；3）一致した解剖学的変化があること。神経疾患としては、例えば、脳血管障害（脳出血、くも膜下出血、脳梗塞、一過性脳虚血発作、脳動脈硬化症、Binswanger病、脳静脈洞血栓・脳静脈血栓、高血圧性脳症、側頭動脈炎、一過性全健忘、もやもや病、線維筋性形成異常症、内頸動脈海綿静脈洞瘻、慢性硬膜下血腫、アミロイドアンギオパチー（Alzheimer病参照）など）；脊髓血管障害（例えば、脊髓梗塞、一過性脊髓虚血、脊髓出血、脊髓血管奇形、脊髓くも膜下出血、亜急性壊死性脊髓炎など）；感染性・炎症性疾患（例えば、髄膜炎、脳炎、単純ヘルペス脳炎、日本脳炎、その他の脳炎、狂犬病、遅発性ウイルス感染症（例えば、亜急性硬化性全脳炎、進行性多巣性白質脳症、Creutzfeldt-Jakob病など）、神経Behcet病、小舞蹈病、AIDS痴呆症候群、神経梅毒、脳膿瘍、脊髓硬膜外膿瘍、HTLV-I関連ミエロパチー、ポリオ）；脱髄疾患（多発性硬化症、急性散在性脳脊髓炎、Baló同心円硬化症、炎症性汎発性硬化症、白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、Krabbe病、副腎白質ジストロフィー、Canavan病（白質ジストロフィー）、Pelizaeus-Merzbacher病（白質ジストロフィー）、Alexander病（白質ジストロフィー）など）；痴呆性疾患（Alzheimer病、Alzheimer型老年痴呆、Pick病、脳血管性痴呆、Cr

e u t z f e l d t-J a k o b 病、P a r k i n s o n 痴呆複合、正常圧水頭症、進行性核上性麻痺など）；基底核変性疾患（例えば、P a r k i n s o n 病、症候性 p a r k i n s o n i s m、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、P a r k i n s o n 痴呆複合、H u n t i n g t o n 病、本態性振戦、アテトーゼ、ジストニー症候群（例えば、特発性捻転ジストニー、局所性ジストニー（痙性斜頸、書痙、M e i g e 症候群など）、症候性ジストニー（H a l l e r v o r d e n-S p a t s 病、薬剤性ジストニーなど）、G i l l e s、d e、l a、T o u r e t t e 症候群など）；脊髄小脳変性疾患（例えば、脊髄小脳変性症（S h y-D r a g e r 症候群、M a c h a d o-J o s e p h 病など）、L o u i s-B a r 症候群、B a s s e n-K o r n z w e i g 症候群、R e f s u m 病、他の小脳失調症など）；運動ニューロン疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症、進行性球麻痺（筋萎縮性側索硬化症参照）、家族性筋萎縮性側索硬化症、W e r d n i g-H o f f m a n n 病、K u g e l b e r g-W e l a n d e r 病、球脊髄性筋萎縮症、若年性一側上肢筋萎縮症など）；脳・脊髄の腫瘍性疾患（例えば、頭蓋内腫瘍、脊髄腫瘍、髄膜癌腫症など）；機能性疾患（例えば、てんかん、慢性頭痛、失神（失神参照）、特発性頭蓋内圧亢進症、M e n i e r e 病、ナルコレプシー、K l e i n e-L e v i n 症候群など）；中毒・代謝性疾患（例えば、薬物中毒（フェノチアジン系向精神薬中毒、鎮静・催眠薬中毒、抗生物質中毒、抗 P a r k i n s o n 病薬、抗癌薬中毒、 $\beta$ 遮断薬中毒、Ca拮抗薬中毒、クロフィブラート中毒、制吐薬中毒、スモン、サリチル酸中毒、ジギタリス中毒、麻薬中毒など）、慢性アルコール中毒（W e r n i c k e 脳症、M a r c h i a f a v a-B i g n a m i 症候群、橋中心髄鞘崩壊症など）、有機溶剤中毒、農薬中毒（例えば、有機リン剤中毒、カーバメイト剤中毒、クロルピクリン中毒、パラコート中毒など）、有機リン系神経ガス中毒、一酸化炭素中毒、硫化水素中毒、シアン化物中毒、水銀中毒（金属水銀中毒、無機水銀中毒、有機水銀中毒など）、鉛中毒、四エチル鉛中毒、ヒ素中毒、カドミウム中毒、クロム中毒、マンガン中毒、金属熱、睡眠薬・鎮静薬中毒、サリチル酸中毒、ジギタリス中毒、麻薬中毒、食中毒（例えば、自然毒食中毒（フグ中毒、麻痺性貝毒食中毒、下痢性貝毒食中毒、シガテラ、キノコ中毒、ジャガイモ中毒など）、ビタミン

欠乏症（ビタミンA欠乏症、ビタミンB1欠乏症、ビタミンB2欠乏症、ペラグラ、壊血病、ビタミン依存症）、リビドーシス（Gaucher病、Niemann-Pick病など）、先天性アミノ酸代謝異常、Wilson病、アミロイドーシスなど）；先天奇形（Arnold-Chiari奇形、Klippel-Feil症候群、頭蓋底陥入症、脊髄空洞症）；神経・皮膚症候群（例えば、母斑症、von-Recklinghausen病、結節性硬化症、Sturge-Weber病、von Hippel-Lindau病など）；脊椎疾患（変形性脊椎症、椎間板ヘルニア、後縦靱帯骨化症など）などが挙げられるがそれらに限定されない。

### 【0198】

本明細書において「神経障害」とは、神経の機能、構造、あるいは両方の障害で、発育における遺伝、発生上の欠陥、または毒素、外傷、疾病など外因性要因に起因するものをいう。そのような神経障害としては、例えば、末梢神経障害、糖尿病性神経障害などが挙げられるがそれらに限定されない。末梢神経は各種の原因で障害されるが、原因のいかんを問わずすべての末梢神経の障害は、総称して神経障害（ニューロパシー）と呼ばれる。神経障害の原因としては、例えば、遺伝、感染、中毒、代謝障害、アレルギー、膠原病、癌、血管障害、外傷、機械的圧迫、腫瘍などが挙げられるがそれらに限定されない。神経障害の原因は、臨床では特定されないことがあるが、本発明の処置の対象にはそのような原因不明の神経障害も包含される。神経障害としては、実質性神経障害および間質性神経障害が挙げられるがそれらに限定されない。実質性神経障害とは、末梢神経の実質であるニューロン、シュワン細胞および髄鞘の少なくとも1つに病因が作用し、病変が現れたものをいい、間質性神経障害とは、間質に作用して障害が現れるものであり、物理的圧迫、血管性病変（結節性動脈周囲炎、膠原病など）、炎症反応、肉芽組織（例えば、癭結節、サルコイドーシスなど）による障害が挙げられるがそれらに限定されない。ニューロン全体の代謝が障害を受けると、ニューロンの末梢部から変性し、神経細胞に向けて変性が進行し、最終的に神経細胞が萎縮する（逆行性死滅神経障害）。神経障害の症候としては、運動障害、知覚障害、筋力低下、筋萎縮、反射低下、自律神経障害、およびそれらの組み合わせな

どが挙げられる。本発明は、このような神経障害の処置、予防などにも有効である。

#### 【0199】

本明細書において「神経の状態」とは、神経の健全度を示す度合いをいう。そのような状態は、種々のパラメータによって表すことができる。本発明により、Pep5、p75、RhogDI、GTLb、MAG、p21などを測定することにより神経の状態が判定できるようになった。

#### 【0200】

本明細書において「再生」とは、損傷した組織ないし臓器が元通りに回復することをいい、病的再生ともいう。生物の体は一生の間に外傷や病気によって臓器の一部を失ったり、大きな傷害を受けたりする。その場合、損傷した臓器が再生できるか否かは、臓器によって（または動物種によって）異なる。自然には再生できない臓器（または組織）を再生させ、機能を回復させようというのが再生医学である。組織が再生したかどうかは、その機能が改善したかにどうかによって判定することができる。哺乳動物は、組織・器官（臓器）を再生する力のある程度備えている（例えば、皮膚、肝臓および血液の再生）。しかし、心臓、肺、脳などの臓器、中枢神経などの組織は再生能力に乏しく、一旦損傷すると、その機能を再生させることができないと考えられてきた。従って、従来であれば、例えば、臓器が損傷した場合、臓器移植による処置しかほとんど有効な措置がなく、移植では処置できない中枢神経などの場合は、有効な処置がないに等しい状態であった。

#### 【0201】

本明細書において「神経の再生」とは、損傷したかあるいは消失した神経が回復することをいう。従来、成体では特に中枢神経の再生は不可能とされており、いったん神経が機能を損なうと、その再生は困難であった。ここで、神経が再生したかどうかは、運動能力、感覚の評価、組織において神経軸索の再生を評価することなどによって確認することができる。

#### 【0202】

（遺伝子治療）

特定の実施形態において、本発明の正常な遺伝子の核酸配列、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

#### 【0203】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法が、本発明に従って使用され得る。例示的な方法は、以下のとおりである。

#### 【0204】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspiehlら, *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIB TECH* 11(5):155-215 (1993)を参照のこと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

#### 【0205】

したがって、本発明では、Pep5、p75、Rho GDI、MAG、p21の遺伝子を用いた遺伝子治療が有用であり得る。

#### 【0206】

本明細書において「形質」および「表現型」という用語は、本明細書では同義に用いられ、生物の可視的な性質、検出可能な性質またはこれ以外の場合における測定可能な性質すべてを意味するものであり、一例として疾患の徴候または疾患に対する感受性があげられる。本明細書では通常、「形質」または「表現型」という用語は、乳房に関する疾患（例えば、乳がん）、肥満または肥満に関連した障害、特に、アテローム性動脈硬化症、インスリン抵抗性、高血圧症、2型糖尿病の肥満個体における細小血管障害、II型糖尿病の肥満個体における細小血管障害に関連した眼病変、またはII型糖尿病の肥満個体における細小血管障害に関連した腎病変の症状またはこれらに対する罹患性を示すときに用いられ得る。

#### 【0207】

本明細書において「遺伝子型」という用語は、ある生物個体の遺伝子の構成をいい、しばしば個体または試料中に存在する対立遺伝子を意味することがある。試料または個体の「遺伝子型を判定する」という表現は、個体の特定の遺伝子の配列を解析することを包含する。

#### 【0208】

本明細書において「多型」という用語は、異なるゲノムまたは個体間で2以上の選択的ゲノム配列または対立遺伝子が出現することを示すために用いられる。「多型（の）」という表現は、特定のゲノム配列の2以上の変異体が個体群に見出される可能性がある状態を示す。「多型部位」は、そのような変異が発生する遺伝子座である。単一ヌクレオチド多型（SNPs）は、多型部位で1つのヌクレオチドが別のヌクレオチドに置換されたものである。1つのヌクレオチドの欠失または1つのヌクレオチドの挿入によっても単一ヌクレオチド多型が生じる。本明細書において「単一ヌクレオチド多型」は、1つのヌクレオチドの置換を示すものであることが好ましい。一般に、異なる個体間では、多型部位を2つの異なるヌクレオチドが占めている場合がある。本発明では、Pep5、p75、RhogDI、MAG、p21の多型もまた、神経疾患に関連すると考えられることから、1つの実施形態では、このような多型の分析によって同定された対立遺伝子を用いることが神経の、再生、予防、診断、治療または予後に有効であり得る。

## 【0 2 0 9】

(治療活性または予防活性の証明)

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、そして次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の、治療有用性または予防有用性を証明するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および／または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるか否かを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養物において増殖し、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

## 【0 2 1 0】

(治療的／予防的な投与および組成物)

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製されたものであり得る（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質が実質的に存在しない状態が挙げられる）。

## 【0 2 1 1】

本明細書において「診断、予防、処置または予後上有効な量」とは、それぞれ、診断、予防、処置（または治療）または予後において、医療上有効であると認められる程度の量をいう。このような量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができる。

## 【0 2 1 2】

本発明が対象とする動物は、神経系または類似の系を有するものであれば、どの生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物））でもよい。好ましくは、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨

魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）であり、より好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）であり得る。例示的な被験体としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない。さらに好ましくは、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）由来の細胞が用いられる。最も好ましくはヒト由来の細胞が用いられる。

#### 【0213】

本発明の核酸分子またはポリペプチドが医薬として使用される場合、そのような組成物は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

#### 【0214】

そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、本発明の医薬は、Pep 5、p 75、Rho GDI、MAG、p 21のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、またはその改変体もしくは誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

#### 【0215】

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例え



ば、ポリビニルピロリドン) ; アミノ酸 (例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン) ; モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物 (グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む) ; キレート剤 (例えば、E D T A) ; 糖アルコール (例えば、マンニトールまたはソルビトール) ; 塩形成対イオン (例えば、ナトリウム) ; ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤 (例えば、T w e e n、プルロニック (p l u r o n i c) またはポリエチレングリコール (P E G) ) などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【 0 2 1 6 】

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤 (例えば、スクロース) を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、p H 7 . 0 - 8 . 5 の T r i s 緩衝剤または p H 4 . 0 - 5 . 5 の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

#### 【 0 2 1 7 】

以下に本発明の医薬組成物の一般的な調製法を示す。なお、動物薬組成物、医薬部外品、水産薬組成物、食品組成物および化粧品組成物等についても公知の調製法により製造することができる。

#### 【 0 2 1 8 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドなどは、薬学的に受容可能なキャリアと配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、粉剤、座剤等の固形製剤、またはシロップ剤、注射剤、懸濁剤、溶液剤、スプレー剤等の液状製剤として経口または非経口的に投与することができる。薬学的に受容可能なキャリアとしては、上述のように、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、崩壊阻害剤、吸収促進剤、吸着剤、保湿剤、溶解補助剤、安定化剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等が挙げられる。また、必要に応じ、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を用いることが

できる。また、本発明の組成物には本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドなど以外の物質を配合することも可能である。非経口の投与経路としては、静脈内注射、筋肉内注射、経鼻、直腸、膣および経皮等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0219】

固形製剤における賦形剤としては、例えば、グルコース、ラクトース、スクロース、D-マンニトール、結晶セルロース、デンプン、炭酸カルシウム、軽質無水ケイ酸、塩化ナトリウム、カオリンおよび尿素等が挙げられる。

#### 【0220】

固形製剤における滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ホウ酸末、コロイド状ケイ酸、タルクおよびポリエチレングリコール等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0221】

固形製剤における結合剤としては、例えば、水、エタノール、プロパノール、白糖、D-マンニトール、結晶セルロース、デキストリン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、デンプン溶液、ゼラチン溶液、ポリビニルピロリドン、リン酸カルシウム、リン酸カリウム、およびシェラック等が挙げられる。

#### 【0222】

固形製剤における崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カンテン末、ラミナラン末、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、アルギン酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプン、ステアリン酸モノグリセリド、ラクトースおよび繊維素グリコール酸カルシウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0223】

固形製剤における崩壊阻害剤の好適な例としては、水素添加油、白糖、ステアリン、カカオ脂および硬化油等が挙げられるがそれらに限定されない。

**【 0 2 2 4 】**

固形製剤における吸収促進剤としては、例えば、第四級アンモニウム塩基類およびラウリル硫酸ナトリウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

**【 0 2 2 5 】**

固形製剤における吸着剤としては、例えば、デンプン、ラクトース、カオリン、ベントナイトおよびコロイド状ケイ酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

**【 0 2 2 6 】**

固形製剤における保湿剤としては、例えば、グリセリン、デンプン等が挙げられるがそれらに限定されない。

**【 0 2 2 7 】**

固形製剤における溶解補助剤としては、例えば、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

**【 0 2 2 8 】**

固形製剤における安定化剤としては、例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等が挙げられるがそれらに限定されない。

**【 0 2 2 9 】**

固形製剤として錠剤、丸剤等を調製する際には、必要により胃溶性または腸溶性物質（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）のフィルムで被覆していてもよい。錠剤には、必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多層錠が含まれる。カプセル剤にはハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。座剤の形態に成形する際には、上記に列挙した添加物以外に、例えば、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、半合成グリセライド等を添加することができるがそれらに限定されない。

**【 0 2 3 0 】**

液状製剤における溶剤の好適な例としては、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油およびトウモロコシ油等が挙げられる。

## 【0231】

液状製剤における溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリシアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0232】

液状製剤における懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0233】

液状製剤における等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0234】

液状製剤における緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩およびクエン酸塩等の緩衝液等が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0235】

液状製剤における無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウムおよび塩酸プロカイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0236】

液状製剤における防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0237】

液状製剤における抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロールおよびシステイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【 0 2 3 8 】

注射剤として調製する際には、液剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましい。通常、これらは、バクテリア保留フィルター等を用いるろ過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化する。さらにこれらの処理後、凍結乾燥等の方法により固形物とし、使用直前に無菌水または無菌の注射用希釈剤（塩酸リドカイン水溶液、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、エタノールまたはこれらの混合溶液等）を添加してもよい。

## 【 0 2 3 9 】

さらに、必要ならば、医薬組成物は、着色料、保存剤、香料、矯味矯臭剤、甘味料等、ならびに他の薬剤を含んでもよい。

## 【 0 2 4 0 】

本発明の医薬は、経口的または非経口的に投与され得る。あるいは、本発明の医薬は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明において使用される医薬は、発熱物質を含まない、薬学的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、pH、等張性、安定性などを考慮することにより、当業者は、容易に行うことができる。本明細書において、投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、腔内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。

## 【 0 2 4 1 】

本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（日本薬局方第14版またはその最新版、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990などを参照）と、所望の程度の純度を有する糖鎖組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で調製され保存され得る。

## 【 0 2 4 2 】

様々な送達系が公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る（例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルなど）。導入方法としては、皮内、筋肉、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられるがそれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により（例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜内層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通しての吸収により）投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路（脳室内注射および髄腔内注射を包含し；脳室内注射は、例えば、Ommaya リザーバのようなりザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る）により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアロゾル化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

## 【 0 2 4 3 】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは組成物を、処置の必要な領域（例えば、中枢神経、脳など）に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせて）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラスティック（s i a l a s t i c）膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、または膠様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する際、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

## 【 0 2 4 4 】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソーム中に封入された状態で送達され得る（L a n g e r, S c i e n c e 2 4 9 : 1 5 2 7 - 1 5 3 3 (1990) ; T r e a t r, L i p o s o m e s i n t h e T h e r a p y o f I n f e c t i o u s D i s e a s e a n d

Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler (編), Liss, New York, 353~365頁(1989); Lopez-Berestein, 同書317~327頁を参照のこと; 広く同書を参照のこと)。

#### 【0245】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は、制御された徐放系中で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る(Langer (前出); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwaldら, Surgery 88:507(1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと)。別の実施形態において、高分子材料が用いられ得る(Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise (編), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall (編), Wiley, New York(1984); RangerおよびPeppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61(1983)を参照のこと; Levyら, Science 228:190(1985); Duringら, Ann. Neurol. 25:351(1989); Howardら, J. Neurosurg. 71:105(1989)もまた参照のこと)。

#### 【0246】

さらに別の実施形態において、制御された徐放系は、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする(例えば、Goods on, Medical Applications of Controlled Release, (前出), 第2巻, 115~138頁(1984)を参照のこと)。

#### 【0247】

他の制御された徐放系は、L a n g e r により総説において議論される (S c i e n c e 2 4 9 : 1 5 2 7 - 1 5 3 3 ( 1 9 9 0 ) ) 。

#### 【 0 2 4 8 】

本発明の処置方法において使用される組成物の量は、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被験体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間－1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

#### 【 0 2 4 9 】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドなどの投与量は、被験体の年齢、体重、症状または投与方法などにより異なり、特に限定されないが、通常成人1日あたり、経口投与の場合、0. 0 1 m g ～ 1 0 g であり、好ましくは、0. 1 m g ～ 1 g 、 1 m g ～ 1 0 0 m g 、 0. 1 m g ～ 1 0 m g などであり得る。非経口投与の場合、0. 0 1 m g ～ 1 g であり、好ましくは、0. 0 1 m g ～ 1 0 0 m g 、 0. 1 m g ～ 1 0 0 m g 、 1 m g ～ 1 0 0 m g 、 0. 1 m g ～ 1 0 m g などであり得る。

#### 【 0 2 5 0 】

本明細書中、「投与する」とは、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドなどまたはそれを含む医薬組成物を、単独で、または他の治療剤と組み合わせて投与することを意味する。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。



## 【0251】

本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与方法または診断する方法などを医師、患者など投与を行う人、診断する人（患者本人であり得る）に対して記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬、医薬などを投与する手順を指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ（ウェブサイト）、電子メール）のような形態でも提供され得る。

## 【0252】

本発明の方法による治療の終了の判断は、商業的に利用できるアッセイもしくは機器使用による標準的な臨床検査室の結果または P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、G T 1 b、p 2 1 に関連する疾患（例えば、神経疾患）に特徴的な臨床症状の消滅によって支持され得る。治療は、P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、G T 1 b、p 2 1 に関連する疾患（例えば、神経疾患）の再発により再開することができる。

本発明はまた、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分を満たした1つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に任意に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。

## 【0253】

（詳細な説明）

本発明者らの研究によって、p 7 5 N T R と R h o G D I との会合が、M A G および N o g o によって増強されることが実証された。p 7 5 N T R は、インビトロにおいて R h o G D I から R h o A を離脱させる能力を有するので、p 7 5 N T R を介した M A G または N o g o による R h o A の活性化は、少なくとも

も部分的に、R h o G D I 置換に起因し得る。R h o G D I からの R h o の離脱は、グアニンヌクレオチド交換因子による活性化および R h o の G T P 結合形態の膜会合を可能にする重要な工程である。p 7 5 N T R 自体は、グアニンヌクレオチド交換のプロセスを媒介し得ないので、いくつかの R h o グアニンヌクレオチド交換因子は、p 7 5 N T R と協同し得る（これは、将来取り組まれるべき論点のうちの 1 つである）。別の R h o G D I 置換因子であるエズリン／ラディキシン／モエシンもまた、S w i s s 3 T 3 細胞中で R h o A の活性化を誘導し、このことは、p 7 5 N T R が R h o A を活性化するという本発明者らの知見に類似することに注意すること。

#### 【0254】

p 7 5 N T R が、発生段階の間の軸索誘導または軸索成長において重要な役割を有するという証拠は増大している（引用文献 1）。p 7 5 N T R に変異を保有するマウスの脊髄運動ニューロンまたは前肢運動ニューロンからの軸索伸展は、インビボで有意に妨害される（引用文献 2、17）。この表現型は、p 7 5 N T R へのリガンド結合に起因し得る。なぜなら、p 7 5 N T R を発現するが T r k A は発現しないヒヨコ毛様体ニューロンは、N G F に応答して神経突起を伸長させるからである。これらの観察と対照的に、異常な軸索伸長が、p 7 5 N T R に変異を保有するマウスにおいて、軸索が通常成長しないミエリンに富む領域中に観察されている（引用文献 18）。これらの知見と一致して、現在までに同定された神経突起伸展のミエリン由来インヒビターの全てが、p 7 5 N T R に依存する成長を阻害している（引用文献 5、6、7）。本発明者らの知見は、これらの効果が、p 7 5 N T R の R h o G D I 置換活性から生じ得るということを示唆する。さらに、p 7 5 N T R 発現ニューロンの軸索先導の誤りは、p 7 5 N T R に変異を保有するマウス中で観察される表現型の間で顕著である（交感神経軸索および皮質サブプレート軸索の誤った標的化を含む）（引用文献 19、20）。R h o は、発生段階における軸索先導の調節に関与しているようなので、p 7 5 N T R の非存在下における誤った標的化は、R h o 活性の適切な調節の失敗に起因し得る可能性があり得る。興味深いことに、近年の報告は、R a c 1 の下流経路の空間的な活性化および時間的な活性化における R h o G D I の役割を示唆

している（引用文献21）。Rho GDIはRac1と会合し、そしてエフェクター結合をブロックするが、インテグリンが局在化する特定の領域におけるRho GDIからのRac1の離脱は、Rac1がそのエフェクターに結合することを可能にする。従って、Rho GDIは、Rho GTPase-エフェクター相互作用の空間的に制限された調節を与えることが示唆されている。さらなる研究において、Rho GDIによって調節されるRhoシグナル伝達の空間的な制御が、軸索先端に参与し得るという仮説を試験することは興味深い。

#### 【0255】

p75<sup>NTR</sup>の短いアイソフォーム（これは、細胞外リガンド結合ドメイン中の4つのシステインリッチリピートのうち3つを欠くが、インタクトな細胞内ドメインを有する）が見出されている（引用文献22）。p75<sup>NTR</sup>遺伝子の第3エキソンの破壊が標的化されたマウス（引用文献23）由来の細胞は、この短い形態のp75<sup>NTR</sup>を発現するが、阻害分子と無反応である（引用文献5、6、7）。本発明者らのデータによって、p75<sup>NTR</sup>の短いアイソフォームを発現するが全長p75<sup>NTR</sup>は発現しないニューロンの神経突起伸展にPep5が影響を与えなかったことが示されたので（図5b）、短いアイソフォームは、神経突起伸展の調節因子として作用し得ない。

#### 【0256】

そのような短いアイソフォームは、細胞内ドメインを構成する成分であることから、好ましい実施形態において、細胞外ドメインを含む成分を含むものが好ましいp75として使用され得る。

#### 【0257】

成体の中枢神経系の軸索は、損傷後に限定された量の再生しか可能ではないこと、ならびに所望されない環境は、再生の欠如に主要な役割を果たすということが、ここで十分に確立された。軸索成長阻害効果のほとんどは、ミエリンと関連する。ミエリン由来インヒビターの同定によって、生物学的活性の分子機構に関する本発明者らの認識が確認された。従って、阻害シグナルを克服するための戦略を探索することが、ここで重要な問題となる。本発明者らは、Pep5が、ミエリン由来インヒビターによって媒介される作用を特異的に阻害するようである

ことに注目した。なぜなら、P e p 5 は、海馬ニューロンからの神経突起伸展の N G F 誘導性増進も（データには示さない）、1 0 0 n g / m l B D N F で処理した上頸神経節ニューロンの細胞死も（データには示さない）阻害しなかったからである。ミエリン関連インヒビター効果の特異的な阻害は、中枢神経系への損傷に対する実質的な治療剤を提供し得る。

#### 【0 2 5 8】

（好ましい実施形態の説明）

以下に本発明の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかです。

#### 【0 2 5 9】

（P e p 5 のポリペプチド形態）

1 つの局面において、本発明は、P e p 5 ポリペプチドを含む神経を再生するための組成物、および P e p 5 ポリペプチドを含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、本明細書の開示に基づいて、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1 9 9 4 を参照）。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって（P e p 5 による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0 2 6 0】

1 つの実施形態において、本発明において用いられる P e p 5、またはそのフ

ラグメントもしくは改変体は、(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；(c) 配列番号 1 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；(d) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または (e) (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する相同性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む。

#### 【0261】

1 つの好ましい実施形態において、上記 (b) における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50 以下、40 以下、30 以下、20 以下、15 以下、10 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Pep5 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0262】

別の好ましい実施形態において、上記 (c) における対立遺伝子変異体は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも 99 % の相同性を有することが好ましい。

#### 【0263】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30 % の相同性を有することが好ましい。

#### 【0264】

別の好ましい実施形態において、上記 (e) における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75 ポリペプチドとの相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0 2 6 5】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約 8 0 % であり得、より好ましくは少なくとも約 9 0 % であり得、さらに好ましくは少なくとも約 9 8 % であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 9 9 % であり得る。

## 【0 2 6 6】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも 3 の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも 4 アミノ酸長、より好ましくは 5 アミノ酸長、6 アミノ酸長、7 アミノ酸長、8 アミノ酸長、9 アミノ酸長、1 0 アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも 1 5 アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも 2 0 アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、1 1、1 2、1 3、1 4、1 6 など）あるいは、それ以上の数（例えば、2 1、2 2、... 3 0、など）であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 2 に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

## 【0 2 6 7】

1 つの実施形態において、P e p 5 ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 2 のアミノ酸に示す全範囲を含む。より好ましくは、P e p 5、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 2 のアミノ酸全範囲からなることが有利であり得る。

## 【0 2 6 8】

1 つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

## 【0 2 6 9】

(P e p 5 の核酸形態)

1つの局面において、本発明は、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経を再生するための組成物、およびP e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって（P e p 5 による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

## 【0 2 7 0】

1つの実施形態において、本発明において用いられるP e p 5 をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、（a）配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列（C F F R G G F F N H N P R Y C）からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；（c）配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）配列番号1に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；（e）配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

ド；または (g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む。

#### 【0 2 7 1】

1 つの好ましい実施形態において、上記 (c) における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、5 0 以下、4 0 以下、3 0 以下、2 0 以下、1 5 以下、1 0 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、P e p 5 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0 2 7 2】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p 7 5 との相互作用、p 7 5 による R h o G D I の機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0 2 7 3】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号 1 に示す核酸配列と少なくとも 9 9 % の相同性を有することが有利である。

#### 【0 2 7 4】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の P e p 5 をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の P e p 5 の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 1 に示す核酸配列と少なくとも約 3 0 % の相同性を有することが好ましい。



## 【0 2 7 5】

好ましい実施形態において、上記（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

## 【0 2 7 6】

好ましい実施形態において、本発明の P e p 5 をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

## 【0 2 7 7】

1つの実施形態において、P e p 5 をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号1の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、P e p 5 をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号1の核酸配列の全範囲からなる。

## 【0 2 7 8】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、ア

ルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0279】

(P 7 5 のポリペプチド形態に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、および p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、本明細書の開示に基づいて、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって（p 7 5 に特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0280】

1つの実施形態において、本発明の因子は、（a）配列番号4に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；（b）配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；（c）配列番号3または16に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；（d）配列番号4に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または（e）（a）～（d）のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性が少なくとも70%で

あるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0 2 8 1】

1つの好ましい実施形態において、上記（b）における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、P 7 5 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0 2 8 2】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0 2 8 3】

別の好ましい実施形態において、上記（c）における対立遺伝子変異体は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 99%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0 2 8 4】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0 2 8 5】

別の好ましい実施形態において、上記（e）における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、R h o G D I との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0 2 8 6】

好ましい実施形態において、上記（a）～（d）のいずれか 1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約 80%であり得、より好ましくは少なくとも約 90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98%であり得、もっとも好

ましくは少なくとも約 9 9 % であり得る。

#### 【 0 2 8 7 】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも 3 の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも 4 アミノ酸長、より好ましくは 5 アミノ酸長、6 アミノ酸長、7 アミノ酸長、8 アミノ酸長、9 アミノ酸長、1 0 アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも 1 5 アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも 2 0 アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、1 1、1 2、1 3、1 4、1 6 など）あるいは、それ以上の数（例えば、2 1、2 2、... 3 0、など）であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 4 に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【 0 2 8 8 】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブとして使用することができる。

#### 【 0 2 8 9 】

1 つの実施形態において、P 7 5 ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 4 のアミノ酸 2 7 3 ~ 4 2 7 位または配列番号 1 7 のアミノ酸 2 7 4 位 ~ 4 2 5 位の範囲を含む。他に好ましい実施形態では、p 7 5 ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 4 のアミノ酸 3 9 3 位 ~ 4 0 8 位、または配列番号 1 7 のアミノ酸 3 9 1 位 ~ 4 0 6 位の範囲を含む。

#### 【 0 2 9 0 】

1 つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、ア

ルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0 2 9 1】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、標識されているかまたは標識と結合し得るものであることが有利であり得る。そのように標識がされている場合、本発明の因子によって測定することができる種々の状態を直接および／または容易に測定することができる。そのような標識は、識別可能に標識される限り、どのような標識でもよく、例えば、蛍光標識、化学発光標識、放射能標識などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、ビオチン-ストレプトアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。

#### 【0 2 9 2】

(p 7 5 ポリペプチドの核酸形態に対して相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、P 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびP 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1 9 9 4 を参照）。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって（p 7 5 に特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

## 【0 2 9 3】

1つの実施形態において、この因子は、（a）配列番号3または16に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；（b）配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；（c）配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）配列番号3または16に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；（e）配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または（g）（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

## 【0 2 9 4】

1つの好ましい実施形態において、上記（c）における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、P 7 5 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

## 【0 2 9 5】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p 7 5 との相互作用、p 7 5 による R h o G D I の機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限

定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【 0 2 9 6 】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号 3 または 1 6 に示す核酸配列と少なくとも 9 9 % の相同性を有することが有利である。

#### 【 0 2 9 7 】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の P 7 5 をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の P 7 5 の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 3 または 1 6 に示す核酸配列と少なくとも約 3 0 % の相同性を有することが好ましい。

#### 【 0 2 9 8 】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約 8 0 % であり得、より好ましくは少なくとも約 9 0 % であり得、さらに好ましくは少なくとも約 9 8 % であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 9 9 % であり得る。

#### 【 0 2 9 9 】

好ましい実施形態において、本発明の P 7 5 をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 1 0 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 1 5 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 2 0 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明

の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 3 または 16 に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約 8 のヌクレオチド長であり得、好ましくは約 10 ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約 15 ヌクレオチド長であり得、好ましくは約 17 ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0300】

1つの実施形態において、P75をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号3の核酸配列の114位～1397位または配列番号16の核酸配列の114～1391位の範囲を含む。より好ましくは、P75をコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号3の核酸配列1位～3386位、または配列番号16の核酸配列1位～3259位の範囲を含む。

#### 【0301】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0302】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0303】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連



続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0304】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記（a）～（g）のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

#### 【0305】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、（a）～（g）のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。

#### 【0306】

（p75細胞外ドメインのポリペプチド形態）

1つの局面において、本発明は、p75細胞外ドメインポリペプチドを含む神経を再生するための組成物、およびp75細胞外ドメインポリペプチドを含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガ

イド、小川紀雄著、中外医学社 1 9 9 4 を参照)。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって (p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドによる)、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

### 【0 3 0 7】

1 つの実施形態において、本発明の p 7 5 細胞外ドメインは、(a) 配列番号 3 または 1 6 に記載の核酸配列の、それぞれヌクレオチド 1 9 8 位～8 6 3 位または 2 0 1 位～8 6 6 位もしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；(b) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 2 9 位～2 5 0 位または 3 0 位～2 5 1 位もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；(c) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 2 9 位～2 5 0 位または 3 0 位～2 5 1 位において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド (d) 配列番号 3 または 1 6 に記載の塩基配列、それぞれヌクレオチド 1 9 8 位～8 6 3 位または 2 0 1 位～8 6 6 位のスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；(e) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 2 9 位～2 5 0 位または 3 0 位～2 5 1 位を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または (f) (a) ～(e) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む。

### 【0 3 0 8】

1 つの好ましい実施形態において、上記 (b) における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、5 0 以下、4 0 以下、3 0 以下、2 0 以下、1 5 以下、1 0 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する (好ましくは、p 7 5 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する) 限り、多い数であってもよい。

**【0 3 0 9】**

別の好ましい実施形態において、上記（c）における対立遺伝子変異体は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % の相同性を有することが好ましい。

**【0 3 1 0】**

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 3 0 % の相同性を有することが好ましい。

**【0 3 1 1】**

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の p 7 5 をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の p 7 5 の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 3 または 1 6 に示す核酸配列または配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 3 0 % の相同性を有することが好ましい。

**【0 3 1 2】**

別の好ましい実施形態において、上記（e）における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、P e p 5 との相互作用、R h o との相互作用、G T 1 b との相互作用、M A G との相互作用、N g R との相互作用、N o g o との相互作用、O M g p との相互作用、p 7 5 による R h o G D I の機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

**【0 3 1 3】**

好ましい実施形態において、上記（a）～（d）のいずれか 1 つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約 8 0 % であり得、より好ましくは少なくとも

約 9 0 % であり得、さらに好ましくは少なくとも約 9 8 % であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 9 9 % であり得る。

#### 【 0 3 1 4 】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも 3 の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも 4 アミノ酸長、より好ましくは 5 アミノ酸長、6 アミノ酸長、7 アミノ酸長、8 アミノ酸長、9 アミノ酸長、1 0 アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも 1 5 アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも 2 0 アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、1 1、1 2、1 3、1 4、1 6 など）あるいは、それ以上の数（例えば、2 1、2 2、. . . 3 0、など）であってもよい。本発明のポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 4 に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【 0 3 1 5 】

1 つの実施形態において、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 4 または 1 7 の、それぞれアミノ酸 2 9 位～2 5 0 位または 3 0 位～2 5 1 位の範囲を含む。より好ましくは、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 4 または 1 7 の、それぞれアミノ酸 2 9 位～2 5 0 位または 3 0 位～2 5 1 位からなる。

#### 【 0 3 1 6 】

1 つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【 0 3 1 7 】

別の実施形態において、本発明の p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性であることが好ましい。そのような可溶性のポリペプチドは、膜貫通ドメインを全部または一部削減することによって遺伝子工学的または合成により作製することができる。

#### 【0318】

(p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドの核酸形態)

1つの局面において、本発明は、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経を再生するための組成物、および p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって（p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドによる）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0319】

1つの実施形態において、本発明において用いられる p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、（a）配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；（b）配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド、（c）配列番号 4 または 17 に記載のアミノ酸配列の、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位において、1

以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) 配列番号 3 または 16 に記載の塩基配列の、それぞれヌクレオチド 198 位～863 位または 201 位～866 位のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；(e) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列、それぞれアミノ酸 29 位～250 位または 30 位～251 位からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；(f) (a) ～(e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または (g) (a) ～(e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、からなる群より選択される、ポリヌクレオチド、を含む。

#### 【0320】

1 つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50 以下、40 以下、30 以下、20 以下、15 以下、10 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、p75 細胞外ドメイン遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0321】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、Pep5 との相互作用、Rho との相互作用、G1b との相互作用、MAG との相互作用、NgR との相互作用、Nogo との相互作用、OMgp との相互作用、p75 による Rho GDI の機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化

定量などによって測定することができる。

#### 【0 3 2 2】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号 3 または 1 6 に示す核酸配列と少なくとも 9 9 % の相同性を有することが有利である。

#### 【0 3 2 3】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の p 7 5 細胞外ドメインをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の p 7 5 細胞外ドメインの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 3 または 1 6 に示す核酸配列と少なくとも約 3 0 % の相同性を有することが好ましい。

#### 【0 3 2 4】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約 8 0 % であり得、より好ましくは少なくとも約 9 0 % であり得、さらに好ましくは少なくとも約 9 8 % であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 9 9 % であり得る。

#### 【0 3 2 5】

好ましい実施形態において、本発明の p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 1 0 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 1 5 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 2 0 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、1 1、1 2、1 3、1 4、1 6 など）あるいは、それ以上の数（例えば、2 1、2 2、... 3 0、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー

、プライマー、プローブ)として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0326】

1つの実施形態において、p75細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号3または16の核酸配列のうち、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位の範囲を含む。より好ましくは、p75細胞外ドメインをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号3または16の核酸配列の、それぞれヌクレオチド198位～863位または201位～866位からなる。

#### 【0327】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0328】

別の実施形態において、本発明のp75細胞外ドメインポリペプチドは、可溶性であることが好ましい。そのような可溶性のポリペプチドをコードする核酸分子は、膜貫通ドメインをコードする核酸配列を全部または一部削減することによって遺伝子工学的または合成により作製することができる。

#### 【0329】

(Rho GDIポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、Rho GDIポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、



および Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994 を参照）。本発明では、神経の再生が、p75 シグナル伝達経路を遮断することによって（Rho GDI ポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0330】

1つの実施形態において、この因子は、（a）配列番号5に記載の核酸配列のヌクレオチドもしくはそのフラグメントによってコードされる、ポリペプチド；（b）配列番号6に記載のアミノ酸配列のアミノ酸もしくはそのフラグメントを有する、ポリペプチド；（c）配列番号6に記載のアミノ酸配列のアミノ酸において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する、改変体ポリペプチド；（d）配列番号5に記載の塩基配列のヌクレオチドのスプライス改変体もしくは対立遺伝子改変体によってコードされる、ポリペプチド；（e）配列番号6に記載のアミノ酸配列のアミノ酸を有するポリペプチドの、種相同体ポリペプチド；または（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列からなり、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチドに対して特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0331】

1つの好ましい実施形態において、上記（b）における置換、付加および欠失

の数は限定されていてもよく、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、RhogDI遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0332】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

#### 【0333】

別の好ましい実施形態において、上記（c）における対立遺伝子変異体は、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0334】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号6に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%の相同性を有することが好ましい。

#### 【0335】

別の好ましい実施形態において、上記（e）における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0336】

好ましい実施形態において、上記（a）～（d）のいずれか1つのポリペプチドに対する相同性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

#### 【0337】

本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、通常、少なくとも3の

連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも4アミノ酸長、より好ましくは5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の因子が特異的に相互作用するポリペプチドは、ある因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号6に示す配列の全長と同一であってもよく、それを超える長さであってもよい。

#### 【0338】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブとして使用することができる。

#### 【0339】

1つの実施形態において、RhogDIポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号6のアミノ酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、RhogDIポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号6のアミノ酸の全範囲からなる。

#### 【0340】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

#### 【0341】

(Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子)

1つの局面において、本発明は、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経を再生するための組成物、およびRho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む神経疾患、神経障害または神経の状態の、処置、予防、診断または予後のための組成物を提供する。ここで、再生、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994を参照）。本発明では、神経の再生が、p75シグナル伝達経路を遮断することによって（Rho GDI ポリペプチドに特異的に相互作用する因子による）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0342】

1つの実施形態において、この因子は、（a）配列番号5に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；（b）配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；（c）配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；（d）配列番号5に記載の塩基配列のスーパー変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；（e）配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；（f）（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチ

ドをコードするポリヌクレオチド；または（g）（a）～（e）のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、と特異的に相互作用する、因子であり得る。

#### 【0343】

1つの好ましい実施形態において、上記（c）における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、RhogDI遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

#### 【0344】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、p75との相互作用、p75によるRhogDIの機能調節の調節などが挙げられるがそれらに限定されない。これらは例えば、免疫学的アッセイ、リン酸化定量などによって測定することができる。

#### 【0345】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号5に示す核酸配列と少なくとも99%の相同性を有することが有利である。

#### 【0346】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明のRhogDIをクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明のRhogDIの全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号5に示す核酸配列と少なくとも約30%の相同

性を有することが好ましい。

#### 【0347】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約 80% であり得、より好ましくは少なくとも約 90% であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98% であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99% であり得る。

#### 【0348】

好ましい実施形態において、本発明の Rho GDI をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 3 または 16 に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約 8 のヌクレオチド長であり得、好ましくは約 10 ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約 15 ヌクレオチド長であり得、好ましくは約 17 ヌクレオチド長であり得る。

#### 【0349】

1 つの実施形態において、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 5 の核酸配列の全範囲を含む。より好ましくは、Rho GDI ポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのフラグメントもしくは改変体は、配列番号 5 の核酸配列の全範囲からなる。

## 【0350】

1つの実施形態において、処置されるべき神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷などを含む。好ましくは、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり得る。他に好ましい実施形態では、本発明の組成物が対象とする神経の疾患、障害または状態は、脊髄損傷、脳血管障害、脳外傷であり得る。

## 【0351】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される。

## 【0352】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、... 30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

## 【0353】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、上記（a）～（g）のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれ

に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

#### 【 0 3 5 4 】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、( a ) ~ ( g ) のいずれかのポリヌクレオチドの核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。

#### 【 0 3 5 5 】

したがって、別の局面において、本発明は、神経突起伸展の阻害を破壊するための組成物を提供する。

#### 【 0 3 5 6 】

( 神経再生法 )

別の局面において、本発明は、神経を再生するための方法を提供する。この方法は、再生に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する。ここで、再生に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1 9 9 4 を参照）。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって（p 7 5 シグナル伝達経路の関連因子）、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【 0 3 5 7 】

1 つの実施形態では、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコード



する核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、本明細書において上記に記載されるような形態をとることができる。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。特に、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、複数用いることが好ましくあり得る。そのような場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子が阻害されることが有利であり得る。

#### 【0358】

別の局面において、本発明はまた、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、複数含む、神経の再生のための組成物を提供する。この場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子を阻害する物質を使用することが有利であり得る。

## 【0359】

(神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後)

別の局面において、本発明は、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための方法を提供する。この方法は、再生に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経に与える工程、を包含する。ここで、再生に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる（神経内科治療ガイド、小川紀雄著、中外医学社 1994 を参照）。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって（p 7 5 シグナル伝達経路の関連因子）、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

## 【0360】

1 つの実施形態では、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、本明細書において上記に記載されるような形態をとることができる。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の障害が破壊されることによることが明らかになった。

このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。特に、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、複数用いることが好ましくあり得る。そのような場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子が阻害されることが有利であり得る。

#### 【0 3 6 1】

別の局面において、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための組成物を提供する。この組成物は、診断、予防、処置または予後に有効な量のP e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの分子を含む。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。

#### 【0 3 6 2】

別の好ましい実施形態では、本発明はまた、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互

作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、複数含む、神経学的疾患、障害または状態の診断、予防、処置または予後のための組成物を提供する。この場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2 つ、3 つあるいは 4 つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子を阻害する物質を使用することが有利であり得る。

### 【 0 3 6 3 】

(神経細胞のネットワーク構築)

本発明はまた、別の局面において、神経細胞のネットワークの構築のための組成物を提供する。

### 【 0 3 6 4 】

ここで、神経細胞のネットワークの構築とは、複数の神経細胞の間で、有機的または情報が移転されるように細胞同士が連結されることをいう。そのようなネットワークを形成した神経細胞は、神経細胞集団ともいう。そのようなネットワークを形成した神経細胞としては、例えば、シナプス形成した神経細胞集団、脳、脊髄、末梢神経などが挙げられるがそれらに限定されない。

### 【 0 3 6 5 】

この神経細胞のネットワークの構築のための組成物は、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む。ここで、神経ネットワーク構築に有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または

種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。

#### 【0 3 6 6】

このようにネットワーク形成された神経細胞（集団）は、神経障害を伴う生物に移植することができる。

#### 【0 3 6 7】

1つの実施形態では、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、本明細書において上記に記載されるような形態をとることができる。本発明では、神経の再生が、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断することによって、神経突起伸展の阻害が破壊されることによることが明らかになった。このようなシグナル伝達経路の遮断による神経再生およびネットワーク形成の効果は従来知られておらず、したがって、本発明は、従来技術より優れた効果を示す。特に、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子は、複数用いることが好ましくあり得る。そのような場合、種々の組み合わせが利用され得る。好ましくは、2つ、3つあるいは4つのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／または因子を用いることができる。別の好ましい実施形態では、経路上の複数の分子が阻害されることが有利であり得る。

#### 【0 3 6 8】

別の局面において、本発明は、神経細胞のネットワークの構築のための方法を提供する。この方法は、ネットワークの構築に有効な量の P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物を該神経細胞に与える工程、を包含する。

### 【0369】

(神経疾患処置キット)

別の局面において、本発明は、神経学的疾患を処置するためのキットを提供する。このキットは、(A) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物によって再生された細胞集団、(B) 該細胞集団を保存するための容器を包含する。

### 【0370】

あるいは、このようなキットは、(A) P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよび R h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物；(B) 神経細胞または神経細胞に分化することができる細胞、(C) 該細胞集団を保存するための容器を包含する。

### 【0371】

上記キットは、神経細胞または神経細胞集団を必要とする疾患（神経疾患、神経障害、神経の異常状態など）の処置に有効である。形成された神経細胞および神経細胞集団は、どのような状態であってもよいが、分化状態が適合していることが好ましい。

#### 【 0 3 7 2 】

本発明のキットにおいて提供される指示書は、指示を伝えることができる限り、どのような形態をとってもよく、紙、コンピュータ読み取り可能な記録媒体（例えば、フレキシブルディスク、CD-R）、電子メール、ウェブサイトなどであり得る。

#### 【 0 3 7 3 】

別の局面において、神経学的疾患を処置するための方法を提供する。この方法は、（a）P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも 1 つの分子を含む組成物によって再生された細胞集団を提供する工程；および（b）該細胞集団を該患者に移植する工程、を包含する。

#### 【 0 3 7 4 】

このような細胞集団はまた、移植片とも呼ばれる。本明細書において「移植片」とは、通常、身体の特定部位に挿入されるべき同種または異種の組織または細胞群であって、身体への挿入後その一部となる。従来の移植片としては、例えば、臓器または臓器の一部、血管、血管様組織、皮片、心臓弁、心膜、硬膜、角膜骨片、歯などが使用されてきた。従って、移植片には、ある部分の欠損部に差し込んで欠損を補うために用いられるものすべてが包含される。移植片としては、そのドナー（d o n o r）の種類によって、自己（自家）移植片（a u t o g r a f t）、同種移植片（同種異系移植片）（a l l o g r a f t）、異種移植片が挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において「免疫反応」とは、

移植片と宿主との間の免疫寛容の失調による反応をいい、例えば、超急性拒絶反応（移植後数分以内）（ $\beta$ -Gal などの抗体による免疫反応）、急性拒絶反応（移植後約 7～21 日の細胞性免疫による反応）、慢性拒絶反応（3 カ月以降の細胞性免疫による拒絶反応）などが挙げられる。本明細書において免疫反応を惹起するかどうかは、HE 染色などを含む染色、免疫染色、組織切片の検鏡によって、移植組織中への細胞（免疫系）浸潤について、その種、数などの病理組織学的検討を行うことにより判定することができる。

#### 【0375】

細胞集団の提供は、本明細書において他の場所において詳述されている。細胞を患者に移植する技術もまた、当該分野において周知の技術を用いることができる。そのような方法は、標準外科学（医学書院）、新外科学大系（中山書店）などに記載されている。本発明の移植片の移植に際しては、上述の一般的な方法において、過大な圧がかからないということに留意することが好ましくあり得る。

#### 【0376】

本発明の移植片または細胞集団は、その中にかまたはそれに伴って、免疫抑制剤をさらに含んでもよい。そのような免疫抑制剤は、当該分野において公知である。免疫抑制の目的では、免疫抑制剤のほか、免疫抑制を達成する別の方法を用いてもよい。上述のような拒絶反応を起こさないようにする免疫抑制法として、免疫抑制剤によるもの、外科的手術、放射線照射等が挙げられる。まず、免疫抑制剤として主なものとして副腎皮質ステロイド薬、シクロスポリン、FK506 等がある。副腎皮質ステロイド薬は循環性 T 細胞の数を減少させ、リンパ球の核酸代謝、サイトカイン産生を阻害してその機能を抑え、マクロファージの遊走および代謝を抑制して免疫反応を抑える。一方、シクロスポリンおよび FK506 の作用は類似しており、ヘルパー T 細胞の表面にある受容体と結合して細胞内に入り込み、DNA に直接働いてインターロイキン 2 の生成を阻害する。最終的には、キラー T 細胞が機能できなくなり免疫抑制作用が起こる。これらの免疫抑制剤の使用においては副作用が問題となる。ステロイドは特に副作用が多く、また、シクロスポリンは肝臓・腎臓に対する毒性がある。また、FK506 は腎



臓に対する毒性を有する。次に外科的手術としては、例えば、リンパ節摘出、脾臓摘出、胸腺摘除が挙げられるが、これらについてはその効果が十分に証明されてはいない。外科的手術の中でも胸管ろうとは、循環しているリンパ球を体外に導くものであり効果も確認されているが、大量の血清タンパク質および脂肪の流出を引き起こし、栄養障害が起こりやすくなるという欠点がある。放射線照射には全身照射と移植片照射があるが、効果が不確実な面もあり、レシピエントに対する負担が大きいので、前述の免疫抑制剤との併用により利用されている。上述のいずれの方法も拒絶反応の防止にはあまり好ましくない。

### 【0377】

(スクリーニング)

本発明はまた、神経再生を誘導する因子を同定するためのスクリーニング方法を提供する。この方法では、P e p 5 ポリペプチド、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドに対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチド、p 7 5 細胞外ドメインポリペプチドをコードする核酸分子、R h o G D I ポリペプチドおよびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの分子とそれらに相互作用する分子との相互作用に、試験因子が有意に影響を与える（減少、増強、消失など）かどうかを判定することによって同定することができる。

### 【0378】

1つの実施形態において、この方法は、(a) 配列番号4に少なくとも70% 相同性であるアミノ酸配列を有する第1のポリペプチドまたはそのフラグメントおよび配列番号6に少なくとも70% 相同性であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドまたはそのフラグメントを、試験因子の存在下で接触させる工程、および(b) 該第1のポリペプチドと該第2のポリペプチドとの間の結合レベルを、該試験因子の非存在下における結合レベルと比較する工程、を包含し、ここで、該試験因子の非存在下と比較して、試験因子の存在下において結合が減少した場合、該試験因子は、神経を再生するための因子として同定される。

### 【0379】

このような試験因子の判定方法は、当該分野において周知であり、任意の統計学的手法を用いて結果を算出することができる。

#### 【0380】

本発明の同定方法において、被検体・患者の提示、選択は任意に行うことができるが、被検体がヒトである場合、コンセンートを事前にもらっておくことが好ましい。被検体としては、神経状態が正常ではないものを提供することができる限りどのようなものでも選択することができる。

#### 【0381】

本発明の同定方法において、次に、本発明の同定方法で用いられる投与工程は、どのような技術を用いてもよい。好ましくは、経口投与、静脈注射など、通常の治療において使用される形態であることが有利である。

#### 【0382】

このようなスクリーニングまたは同定の方法は、当該分野において周知であり、例えば、そのようなスクリーニングまたは同定は、マイクロタイタープレート、DNAまたはプロテインなどの生体分子アレイまたはチップを用いて行うことができる。スクリーニングの試験因子を含む対象としては、例えば、遺伝子のライブラリー、コンビナトリアルライブラリーで合成した化合物ライブラリーなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0383】

したがって、本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

#### 【0384】

本発明は、他の実施形態において、本発明の化合物に対する調節活性についての有効性のスクリーニングの道具として、コンピュータによる定量的構造活性相関 (quantitative structure activity relationship = QSAR) モデル化技術を使用して得られる化合物を包含する。ここで、コンピューター技術は、いくつかのコンピュータによって作成した基質鑄型、ファーマコフォア、ならびに本発明の活性部位の相同モデルの作製などを包含する。一般に、インビトロで得られたデータから、ある物質に対す

る相互作用物質の通常の特徴基をモデル化することに対する方法は、最近CATALYST<sup>TM</sup> ファーマコフォア法 (Ekins et al., Pharmacogenetics, 9:477~489, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 288:21~29, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 290:429~438, 1999; Ekins et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther., 291:424~433, 1999) および比較分子電界分析 (comparative molecular field analysis; CoMFA) (Jones et al., Drug Metabolism & Disposition, 24:1~6, 1996) などを使用して示されている。本発明において、コンピュータモデリングは、分子モデル化ソフトウェア (例えば、CATALYST<sup>TM</sup> バージョン4 (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA) など) を使用して行われ得る。

#### 【0385】

活性部位に対する化合物のフィッティングは、当該分野で公知の種々のコンピュータモデリング技術のいずれかを使用して行うことができる。視覚による検査および活性部位に対する化合物のマニュアルによる操作は、QUANTA (Molecular Simulations, Burlington, MA, 1992)、SYBYL (Molecular Modeling Software, Tripos Associates, Inc., St. Louis, MO, 1992)、AMBER (Weiner et al., J. Am. Chem. Soc., 106:765-784, 1984)、CHARMM (Brooks et al., J. Comp. Chem., 4:187~217, 1983) などのようなプログラムを使用して行うことができる。これに加え、CHARMM、AMBERなどのような標準的な力場を使用してエネルギーの最小化を行うこともできる。他のさらに特殊化されたコンピュータモデリングは、GRID (Goodford et al., J. Med. Chem., 28:849~857, 1985)、MCSS (Miranker and Karplu

s, Function and Genetics, 11:29~34, 1991)、AUTODOCK (Goodsell and Olsen, Proteins: Structure, Function and Genetics, 8:195~202, 1990)、DOCK (Kuntz et al., J. Mol. Biol., 161:269~288, (1982)) などを含む。さらなる構造の化合物は、空白の活性部位、既知の低分子化合物における活性部位などに、LUDI (Bohm, J. Comp. Aid. Molec. Design, 6:61~78, 1992)、LEGEND (Nishibata and Itai, Tetrahedron, 47:8985, 1991)、LeapFrog (Tripos Associates, St. Louis, MO) などのようなコンピュータプログラムを使用して新規に構築することもできる。このようなモデリングは、当該分野において周知慣用されており、当業者は、本明細書の開示に従って、適宜本発明の範囲に入る化合物を設計することができる。

#### 【0386】

別の局面において、本発明は、本発明の上記同定方法によって同定される、調節因子を提供する。

#### 【0387】

別の局面において、本発明は、本発明の調節因子を含む、薬学的組成物を提供する。

#### 【0388】

別の局面において、本発明は、神経学的疾患、障害または状態を、予防または処置する方法を提供する。ここで、この方法は、本発明の調節因子を含む薬学的組成物を被験体に投与する工程を包含する。好ましくは、この神経に関連する状態、障害または疾患は、同定方法において有効であると判断された異常、障害または疾患であり、好ましくはアルツハイマー病を包含するがそれに限定されない。

#### 【0389】

神経に関連する疾患、障害および状態は、その治療について根本的な治療が困

難といわれてきた。しかし、本発明の上述のような効果によって、従来では不可能とされていた早期診断が可能となり、治療にも応用することができることが明らかとなった。したがって、本発明は、従来の診断薬でも医薬でも達成不可能であった有用性を有するといえる。

#### 【0390】

(トランスジェニック動物)

別の局面において、本発明はまた、P e p 5 ポリペプチドをコードする核酸分子、p 7 5 ポリペプチドをコードする核酸分子およびR h o G D I ポリペプチドをコードする核酸分子からなる群より選択される少なくとも1つの核酸分子の配列において野生型とは異なる配列が導入された配列を有する核酸分子を含む、ベクターを提供する。このベクターは、種々の目的で用いることができ、例えば、トランスジェニック動物の生産、改変ポリペプチドの産生などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0391】

したがって、本発明は、このようなベクターを含む、細胞、組織、臓器、生物を提供する。また、本発明はまた、このようなベクターで形質転換された神経改変トランスジェニック動物を提供する。動物を作製する方法は、東亜異分野において公知である。

#### 【0392】

別の局面において、本発明は、本発明の遺伝子がノックアウトされたノックアウト動物を提供する。

#### 【0393】

本明細書において、「ノックアウト」とは、遺伝子について言及されるとき、その遺伝子を破壊（欠損）または機能不全にさせることをいう。

#### 【0394】

本明細書において、「ノックアウト動物」とは、ある遺伝子がノックアウトされた動物（例えば、マウス）をいう。

#### 【0395】

本明細書において、「動物」は、ノックアウトすることができるものであれば

どのような動物であってもよい。従って、動物には、脊椎動物および無脊椎動物が含まれる。動物としては、哺乳動物（例えば、マウス、イヌ、ネコ、ラット、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、イルカ、クジラ、ヤギ、ウマなど）、鳥類（例えば、ニワトリ、ウズラなど）、両生類（例えば、カエルなど）、爬虫類、昆虫（例えば、ショウジョウバエなど）などが挙げられる。好ましくは、動物は、哺乳動物であり得、より好ましくは、ノックアウトを作製することが容易な動物（例えば、マウス）であり得る。別の好ましい形態では、動物は、ヒトのモデル動物として適切であることが判明している動物（例えば、サル）であり得る。ある実施形態では、動物は、非ヒト動物であり得るが、それに限定されない。

### 【0396】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

### 【0397】

#### 【実施例】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。動物の取り扱い、大阪大学において規定される基準を遵守した。

### 【0398】

（材料および方法）

（動物）

p75<sup>NT</sup>R 遺伝子の第3エキソンの標的化された崩壊を保有するマウス系統（引用文献23）を使用した。このマウスは、C57BL/6Jバックグラウンドで、最初はJackson Laboratory（Bar Harbor, Maine）から入手した。

### 【0399】

（同時免疫沈降）

アミノ末端をFLAGタグ化したヒトp75<sup>NT</sup>R（配列番号3および4）および／またはHAタグ化Rhoad<sup>2</sup>（配列番号5および6）を、Lipofect

tamine 2000 (Gibco BRL) を用いてリポフェクションによって293T細胞またはNIH-3T3細胞にトランスフェクトした。細胞を、溶解緩衝液(10mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.2% NP-40、25μg/ml ロイペプチンおよび25μg/ml アプロチニン)を用いて20分間氷上で溶解した。この溶解物を、20分間13,000gで遠心分離し、そしてこの上清を収集した。次いでこれらを、抗FLAG抗体(FLAG-p75<sup>NTR</sup>でトランスフェクトしたものに対して)または抗p75抗体(Chemicon)(小脳ニューロンに対して)を用いて3時間インキュベートした。免疫複合体を、プロテインAセファロース(Amersham Pharmacia)を用いて収集した。懸濁液を、1,000gで5分間遠心分離した。このペレットを、溶解緩衝液を用いて4回洗浄し、SDS-PAGEに供し、続いて抗Rho GDIα抗体(Sigma)または抗RhoA抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いて免疫ブロット分析に供した。示された場合、組換えラットMAF-Fcキメラ(25μg/ml、RD Systems Inc.)、Nogoペプチド(4μM、Alpha Diagnostic; 配列番号10)、TAT融合Pep5(TAT-CFFRGGFFNHNPRYC)(配列番号2)、またはTAT融合コントロールペプチド(TAT-GGWKWWPGIF)(配列番号15)を使用した。これらのペプチドを、化学合成し、そしてその組成物を、アミノ酸分析および質量分析法(Sigma Genosys)によって確認した。アミノ末端をFLAGタグ化したヒトp75<sup>NTR</sup>を、pcDNA3.1発現プラスミド(Invitrogen)にクローニングした。

#### 【0400】

(p75<sup>NTR</sup>およびRho GDIの同時免疫沈降)

抗FLAG抗体およびプロテインAセファロースを用いてトランスフェクトした293T細胞から沈降したp75<sup>NTR</sup>を、200μlの緩衝液(20mM Tris-HCl (pH7.5)、100mM NaCl、10mM EDTA、0.025% Tween20)中で組換えヒトGST-Rho GDI(Cytoskeleton)またはGST-RhoA(Cytoskeleton

）と共に2時間インキュベートし、洗浄した。得られる沈降物を、SDS-PAGE後に二フッ化ポリビニリデン膜に電気泳動的に転写し、そして抗GST抗体（Sigma）を用いてイムノブロットした。ヌクレオチド依存性を調べるために、GST-RhoAを、適切なヌクレオチドを用いてプレロードし、そしてEDTAを10mM MgCl<sub>2</sub>と置換した。示された場合、Pep5またはコントロールペプチド（GGWKWWPGIF（配列番号15））を使用した。

#### 【0401】

（組換えタンパク質の産生）

欠失を有するかまたは有さないp75<sup>NTR</sup> ICDコード配列を、pGEX-5X細菌発現ベクター（Amersham Biosciences）にクローニングして、E. coliからGST融合タンパク質を作製した。pGEX-GST-Rho GDIは、Y. Takai博士から提供された。細胞を600nm（OD<sub>600</sub>）で1.0の光学濃度に増殖させた後、1mM イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド（IPTG）を添加してタンパク質合成を誘導し、そして細胞をさらに16時間25℃にて増殖させた。グルタチオン-セファロース4B（Amersham Biosciences）を用いて融合タンパク質を精製し、そしてGST部分を、除去して、組換えRho GDIを生成した。タンパク質の純度は、SDS-PAGEによって決定し、そして濃度を測定した。ラットp75<sup>NTR</sup> ICDの欠失変異体は、配列番号17において残基274～342、残基274～351、残基274～363、残基274～375、残基274～390、残基274～406および残基274～425である（引用文献24）。GST-p75<sup>NTR</sup>変異体とRho GDIとの複合体形成を、GST-p75<sup>NTR</sup>変異体の沈降によって評価した。

#### 【0402】

（GTP-RhoAのアフィニティー沈降）

アミノ末端でFLAGタグ化したヒトp75<sup>NTR</sup>またはp75<sup>NTR</sup> ICDの欠失変異体を、pcDNA3.1発現プラスミドにクローニングし、そしてこれらを、293T細胞にトランスフェクトした。細胞を、50mM Tris（pH7.5）、1% Triton X-100、0.5% デオキシコール



酸ナトリウム、0.1% SDS、500mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、ならびに10μg/ml ロイペプチンおよび10μg/ml アプロチニン中に溶解した（引用文献25）。細胞溶解物を、13,000g、4℃で10分間の遠心分離によって清澄化し、上清を、Rhotekinビーズ（Upstate Biotechnology）のGST-Rho結合ドメインの20μgを用いて、4℃にて45分間インキュベートした。このビーズを、洗浄緩衝液（1% Triton X-100、150mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、10μg/ml ロイペプチンおよび10μg/ml アプロチニンを含む、50mM Tris（pH7.5））を用いて4回洗浄した。結合したRhoタンパク質を、RhoAに対するモノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology）を用いてウエスタンブロッティングによって検出した。

#### 【0403】

（インビトロヌクレオチド交換アッセイ）

脂質改変したRhoAを、記載されるように（引用文献26）、酵母の膜から精製した。Rho GDIと複合体化した[<sup>3</sup>H]GDP-RhoAまたはRho GDIと複合体化したGDP-RhoAを、以前に記載されるように（引用文献13）、[<sup>3</sup>H]GDPの存在下または非存在下でGDP-RhoAを最初にインキュベートし、続いてRho GDIと30分間インキュベートすることによって得た。ゲル濾過に供したサンプルを、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM ジチオトレイトールおよび0.1% CHAPSを含む20mM Tris-HCl（pH7.5）を用いて平衡化した。GDP解離およびGTP結合アッセイを、以前に記載されたように（引用文献27）、フィルター結合方法によって実行した。[<sup>3</sup>H]GDP解離アッセイにおいて、50nMの複合体を、30mM Tris-HCl（pH7.5）、5mM MgCl<sub>2</sub>もしくは0.5μM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA（低濃度Mg）もしくは10mM EDTA（高濃度Mg）、0.1mM GTP、1mM ジチオトレイトール、0.12% CHAPS、ならびに0.2mg/ml ウシ血清アルブミン含む反応混合物（50μl）中、種々の濃度のGST-融合タンパク質を用いて20分間インキュベ

ートした。[ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S 結合アッセイにおいて、 $1\ \mu\text{M}$  [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S を  $0.1\ \text{mM}$  GTP の代わりに使用した以外、複合体を上記のようにインキュベートした。示された時間において、反応サンプルのアリコートを取り出し、ニトロセルロースフィルター (IPVH 000、Millipore) に通した。このフィルターを洗浄し、シンチレーションでのカウントに使用した。GSTタンパク質または緩衝液を、コントロールとして使用した。Hisタグ化した Dbp1 の触媒ドメインを、 $90\ \text{nM}$  の濃度で使用した。

#### 【0404】

(神経突起伸展アッセイ (インビトロ))

脊髄神経節を、成体マウスから取り出し、そして  $0.025\%$  トリプシンおよび  $0.15\%$  1 型コラゲナーゼ (Sigma) を用いた  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間のインキュベーションによって、単一細胞に分離させた。小脳ニューロンについて、2 匹の動物由来の小脳を、 $5\ \text{ml}$  の  $0.025\%$  トリプシン中で合わせ、粉碎し、そして  $37^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。 $10\%$  FCS を含む DMEM を、添加し、細胞を  $800\ \text{rpm}$  にて遠心分離した。ニューロンを、ポリ-L-リジンでコーティングしたチャンバスライド上の Sato 培地 (引用文献 28) 中、プレートに播いた。伸展アッセイについて、プレートに播いた細胞を、24 時間インキュベートし、そして  $4\%$  (重量/容積) パラホルムアルデヒド中で固定し、そしてニューロン特異的  $\beta$  チューブリン III タンパク質を認識するモノクローナル抗体 (TuJ1) を用いて免疫染色した。次いで、最も長い神経突起の長さまたは各  $\beta$  チューブリン III 陽性ニューロンの総プロセスでの伸展を、決定した。示される場合、MAG-Fc ( $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) または Nogo ペプチド ( $4\ \mu\text{M}$ ) を、プレートに播いた後、培地に添加した。pEF-BOS-myc-Rho GDI プラスミド (これは、Yoshimi Takai 博士によって提供された) または pEGFP プラスミドを、トランスフェクトのコントロールとして使用した。リポフェクションによるトランスフェクションの 24 時間後、細胞を再びプレートに播き、そして 24 時間インキュベートした。トランスフェクトされた細胞を決定するために、細胞を、透過化处理し、そして抗 myc 抗体 ( $1:1000$ 、Sigma) を用いて免疫染色した。

## 【0405】

(サイレンサおよび／または p75<sup>NT</sup>R と Rho GDI との間の相互作用を破壊する因子の、哺乳動物における神経再生効果)

200gの雄のWistarラットを使用して、第9胸椎の椎弓切除術を行った後、脊髄の背側半分を切断した。持続浸透圧ポンプを用いて損傷部位へのTAT融合Pept5 (TAT-CFFRGGFNHNPRYC) またはTAT-融合コントロールペプチド (TAT-GGWKWWPGIF) のいずれかの持続的な投与を6週間 (1mg/体重/日) 行った。その際、ポンプに接続したチューブの先端を髄空内に留置した。脊髄損傷後の機能回復の指標として、BBBスコアを使用し、損傷後7日、14日、21日、28日、35日、42日後に観察を行った。これらの実験は、Fournier A. E., Takizawa, B. T., Strittmatter, S. M., J. Neurosci. 2003, 23, 1416-1423に記載される技術を用いて行った。

## 【0406】

同様の実験を、抗p75<sup>NT</sup>R抗体、抗Rho GDI抗体、およびp75<sup>NT</sup>Rの細胞外ドメインを用いて実施した。

## 【0407】

これらの実験は、Fournier A. E., Takizawa, B. T., Strittmatter, S. M., J. Neurosci. 2003, 23, 1416-1423に記載される技術を用いて行った。

## 【0408】

(実施例1: p75<sup>NT</sup>RとRho GDIとの結合)

本発明者らはまず、RhoAとRho GDIとの複合体がp75<sup>NT</sup>Rの細胞内ドメインと会合するか否かを調べた。内因性にRho GDIを発現するがp75<sup>NT</sup>Rは発現しない293細胞を、FLAGタグ化p75<sup>NT</sup>RおよびHAタグ化野生型RhoAを用いてトランスフェクトした。p75<sup>NT</sup>R沈降物において、抗Rho GDI抗体によって、Rho GDIに対応するタンパク質の存在が明らかになった (図1a)。以前示されたように (非特許文献2)、RhoAは、複合体中に含まれていた。本発明者らは次に、この相互作用が、p7

5 NTR 依存性機構を介して RhoA を活性化することが示されている MAG または Nogo によって強化されるか否かを調べた。内因性の Nogo レセプターを発現する（データには示さない）N1E-115 細胞を、FLAG タグ化 p75 NTR を用いてトランスフェクトした。Nogo の細胞外フラグメントの残基 31～55 に対応するペプチド（4  $\mu$ M）（参考文献 9）および可溶性 MAG-Fc（25  $\mu$ g/ml）は、p75 NTR と Rho GDI および RhoA との相互作用を有意に増強した（図 1b）。対照的に、p75 NTR によって RhoA を不活性化する NGF（100 ng/ml）は、p75 NTR と Rho GDI および RhoA との相互作用を破壊した。本発明者らは、以前に、内因性 p75 NTR と RhoA との相互作用がニューロン中で観察され得ないということに注目していた（参考文献 2）。従って、本発明者らは、マウス由来の生後小脳ニューロン（P9）から調製した溶解物を用いて、内因性 p75 NTR と Rho GDI および RhoA との相互作用を調べた。図 1c に示されるように、内因性 p75 NTR と RhoA および Rho GDI との会合が、MAG または Nogo を用いた刺激の後にのみ観察され、このことは、p75 NTR が、内因性 p75 NTR を発現する細胞において RhoA の構成性アクチベーターではあり得ないことを示唆する。これらの知見は、RhoA と複合体化した Rho GDI が、p75 NTR と相互作用すること、そしてこの相互作用が MAG および Nogo によって強化されることを実証する。

#### 【0409】

（実施例 2：p75 NTR と Rho GDI との直接的相互作用）

RhoA が、酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって p75 NTR 相互作用タンパク質として単離されたので、RhoA は、p75 NTR に直接結合することが示唆された（参考文献 2）。しかし、酵母における内因性 Rho GDI が哺乳動物 Rho ファミリーのメンバーに対して活性であるという事実は、酵母 Rho GDI と複合体化した RhoA が酵母中の p75 NTR と会合し得るという代替的な可能性も議論の余地があるものとしている。従って、本発明者らは次に、精製組換えタンパク質を用いて、p75 NTR と Rho GDI または RhoA との直接的な物理的相互作用を調べた。GDP 結合状態の細菌産生させ

た RhoA、GTP 結合状態の細菌産生させた RhoA、またはヌクレオチド涸渇状態の細菌産生させた RhoA を、トランスフェクトした 293T 細胞から免疫沈降した p75<sup>NTR</sup> と共にインキュベートした。しかし、本発明者らは、いかなるヌクレオチド状態においてもこれらの間の相互作用を観察しなかった（図 2a）。興味深いことに、組換え Rho GDI は、p75<sup>NTR</sup> に結合した。プレニル化 RhoA が Rho GDI と複合体化した場合、このプレニル化 RhoA は p75<sup>NTR</sup> と会合し、このことは、RhoA ではなく Rho GDI が、p75<sup>NTR</sup> と直接複合体化することを示唆する。

#### 【0410】

本発明者らは、Rho GDI と p75<sup>NTR</sup> との間の相互作用の、構造的な基礎を決定した。p75<sup>NTR</sup> の細胞内ドメイン（ICD）の 6 個の  $\alpha$  ヘリックスのうちの 5 番目が、14 マーのペプチドであるマストパランと有意な類似性を示す。マストパランは、RhoA を活性化することが公知の毒バチの両親媒性成分である。p75<sup>NTR</sup> ICD の欠失変異体を用いた実験によって、この 5 番目のヘリックスが p75<sup>NTR</sup> と Rho GDI との相互作用に必要であることが示された（図 2b）。これらの結果は、MAG および Nogo による RhoA の活性化が、Rho GDI と p75<sup>NTR</sup> ICD の第 5 ヘリックスとの相互作用に依存し得ることを示唆する。この仮説をより直接的に試験するために、本発明者らは、内因性に p75<sup>NTR</sup> を発現しない 293 細胞を使用した。RhoA の GTP 結合形態のアフィニティー沈降によって、以前に示されたように（非特許文献 2）、RhoA が全長 p75<sup>NTR</sup> または p75<sup>NTR</sup> ICD の過剰発現によって活性化されることが明らかになった。予想したように、この第 5 ヘリックスを欠く欠失変異体は、RhoA を活性化しなかった（図 2c）。このことは、この第 5 ヘリックスが p75<sup>NTR</sup> による RhoA の活性化に必要であることを実証する。

#### 【0411】

（実施例 3：Rho GDI から RhoA を離脱させる、p75<sup>NTR</sup> の置換効果）

細菌によって発現させた p75<sup>NTR</sup> を用いたインビトロアッセイでの実験に

よって、組換え R h o A に対する G D P / G T P 交換活性は示されなかった (図 3 a)。これらの結果は、R h o A が p 7 5 N T R と直接会合しないという事実と組合わせると、p 7 5 N T R が R h o G D I の活性を低減し、ゆえに、R h o G D I からの R h o A の離脱を促進するという可能性を生じさせる。この工程は、グアニンヌクレオチド交換因子による活性化および R h o タンパク質の G T P 結合形態の膜会合を可能にする (引用文献 8)。本発明者らはまず、低濃度 M g <sup>2+</sup> において R h o A の G D P / G T P 交換反応を阻害する R h o G D I の能力に対する、R h o G D I と p 7 5 N T R のらせンドメイン (HD) との相互作用の効果を調べた。なぜなら、R h o G D I の阻害効果は、低濃度の M g <sup>2+</sup> においてより明らかであるからである (引用文献 13)。この反応は、R h o G D I と複合体化した [ <sup>3</sup> H ] G D P - R h o A からの [ <sup>3</sup> H ] G D P の解離、ならびに R h o G D I と複合体化した G D P - R h o A に対する [ <sup>35</sup> S ] G T P γ S の結合を測定することによって、概算した。p 7 5 N T R HD は、用量依存様式で R h o G D I 活性を低減した (図 3 b)。比較可能な条件下で、グルタチオン S トランスフェラーゼ (G S T) は、R h o G D I 活性に影響を与えなかった (図 3 b)。これらの結果は、p 7 5 N T R HD が R h o

G D I と直接相互作用して、R h o A の G D P / G T P 交換反応を阻害する R h o G D I の能力を低減させる能力を有することを実証する。本発明者らは次に、高濃度 M g <sup>2+</sup> における R h o A の D b l 刺激 G D P / G T P 交換反応を阻害する R h o G D I 能力に対する、p 7 5 N T R HD の効果を調べた。R h o グアニンヌクレオチド交換因子 (R h o G E F) (例えば、D b l) は、R h o G D I 非存在下で G D P - R h o A の G D P / G T P 交換反応を刺激するが、高濃度 M g <sup>2+</sup> において R h o G D I と複合体化した G D P - R h o A の G D P / G T P 交換反応は刺激しない (引用文献 14)。D b l は、G D P - R h o A からの G D P の解離を刺激した (図 3 a) が、R h o G D I と複合体化した G D P - R h o A からの G D P の解離は、顕著に低減された (図 3 c)。しかし、G D P の解離は、p 7 5 N T R HD によって回復した。R h o G D I 活性に対する p 7 5 N T R HD の阻害効果は、用量依存的であった。p 7 5 N T R I C D は、p 7 5 N T R HD と同じ程度の阻害効果を示した (図 3 c)

。これらの結果は、R h o G D I と p 7 5 H D との相互作用が、R h o G E F 非依存性の R h o A の G D P / G T P 交換反応および R h o G E F 依存性の R h o A の G D P / G T P 交換反応の両方で、R h o G D I の活性を増大させることを実証する。

#### 【0412】

p 7 5 N T R はインビトロにおいて R h o G D I から R h o A を離脱させる能力を有するので、p 7 5 N T R を介した M A G および N o g o による R h o A の活性化は、R h o G D I から R h o を離脱させる活性に起因し得る。M A G ならびに N o g o ペプチドは、生後小脳ニューロンからの神経突起伸展を有意に阻害したが、R h o G D I の過剰発現は、これらの阻害効果を破壊した（図 3 d）。これらの結果は、p 7 5 N T R が R h o G D I 解離因子として作用するという本発明者らの示唆と一致する。

#### 【0413】

（実施例 4：p 7 5 N T R と R h o G D I との相互作用に対するペプチドリガンドの効果）

現在までに同定されている軸索再生のミエリン由来インヒビターの全ては、p 7 5 N T R を介してニューロンに作用し、中枢神経系への損傷後の p 7 5 N T R シグナル伝達の妨害は、軸索再生のミエリン依存性阻害を緩和し得る。R h o G D I 会合の正確な領域を示すことによって、本発明者らは、p 7 5 N T R の機能の特異的に阻害する戦略を開発することが可能となった。p 7 5 N T R H D への特異的なペプチドリガンドは、以前コンビナトリアルライブラリーから得られた（参考文献 15）。このリガンドは、15 アミノ酸残基のペプチド（P e p 5 ; C F F R G G F F N H N P R Y C（配列番号 2））であり、そして結合部位は、核磁気共鳴分光法によって、ヘリックス 5 およびヘリックス 6 によって組み立てられる疎水性断片上にマッピングされた。しかし、このペプチド配列が哺乳動物中に存在するタンパク質であるということは示唆されなかった。本発明者らは、このペプチドが R h o G D I の p 7 5 N T R H D に対するリクルートメントを破壊するサイレンサとしての役割を果たし得るという可能性に興味を持ち、そして驚くべきことに、実際にこのペプチドがサイレンサとして機能し得るこ

とを実証した。本発明者らはまず、p75<sup>NTR</sup>がPep5と会合するか否かを確認した。Pep5を含有するグルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質（GST-Pep5）を、p75<sup>NTR</sup>を豊富に発現する生後小脳由来から調製した溶解物と共にインキュベートした。GST-Pep5沈降物において、抗p75<sup>NTR</sup>抗体によって、p75<sup>NTR</sup>に対応するタンパク質の存在が明らかになった（図4a）。次いで、結合親和性をPep5とRhogDI、p75<sup>NTR</sup>との間で比較した。トランスフェクトした293T細胞の溶解物を免疫沈降し、精製したp75<sup>NTR</sup>を、1 $\mu$ M GST-RhogDIおよび示された濃度のPep5と共にインキュベートした（図4b）。Pep5は、p75<sup>NTR</sup>とRhogDIとの会合を用量依存的に阻害したが、コントロールペプチドは阻害しなかった。従って、Pep5は、インビトロにおいてp75<sup>NTR</sup>によって媒介されるシグナルを破壊する能力を有する。このペプチドリガンドは、インビボにおいてp75<sup>NTR</sup> HDに対して直接的に作用する場合、細胞への侵入を増大させなければならないので、本発明者らは、ヒト免疫不全ウイルスタンパク質からのアミノ末端11アミノ酸タンパク質膜貫通ドメインと融合させたPep5（TAT-Pep5）を作製した（参考文献16）。解離小脳ニューロンにおけるMAG-Fcによって誘導されるp75<sup>NTR</sup>とRhogDIとの相互作用は、競合様式でTAT-Pep5によって有意に阻害されたが、TAT-融合コントロールペプチドによって阻害されなかった（図4c）。従って、Pep5は、p75<sup>NTR</sup>とのRhogDI会合のインヒビターとして使用され得る。

#### 【0414】

同様の結果が、抗p75<sup>NTR</sup>抗体、抗RhogDI抗体、およびp75<sup>NTR</sup>の細胞外ドメインを用いて実施した場合にも観察された（未公開データ）。

#### 【0415】

（実施例5：Pep5によるミエリンシグナルのサイレント化）

本発明者らが次に取り組んだ問題は、Pep5がMAGまたはNogoの効果阻害するか否かということである。本発明者らは、MAGまたはNogoの効果測定のために神経突起成長アッセイを使用した。本発明者らは、配列番号



4の残基368～381に対応するラット p75<sup>NT</sup>R由来の別のコントロールペプチドを使用した。このペプチドは、100 nM (図5b) または10  $\mu$ M (データには示さない) の濃度において、脊髄神経節 (DRG) ニューロンの神経突起伸展に影響を与えず、そしてMAG-Fcの作用にも (図5b) Nogoペプチドの作用にも (データには示さない) 影響を与えなかった。しかし、100 nMの濃度で培養ニューロンに外因的に添加されたTAT-Pep5は、MAG (25  $\mu$ g/ml) ならびにNogoペプチド (4  $\mu$ M) に対する応答性を破壊した (図5a、b)。生後小脳ニューロンを使用して、Pep5の効果を調べた。DRGニューロンにおいて観察されたように、TAT-Pep5は、MAG (25  $\mu$ g/ml) およびNogoペプチド (4  $\mu$ M) の阻害効果を効果的にサイレント化した (図5c、d)。最後に、このペプチドがp75<sup>NT</sup>Rシグナル伝達のサイレンサとして作用することをより明確に示すために、本発明者らは、アフィニティー免疫沈降によってRho活性を測定した。予想したように、RhoAは、MAG-FcまたはNogoペプチドの生後小脳ニューロンへの添加30分後に活性化されたが、TAT-Pep5は、これらの細胞に対するMAG-FcまたはNogoペプチドによって誘導されるRhoAの活性化を阻害した (図5e)。これらの知見は、Pep5がRho GDIとp75<sup>NT</sup>Rとの会合を阻害することによって、p75<sup>NT</sup>Rを介したRhoAの活性化を阻害することを、強く示唆する。

#### 【0416】

同様の結果が、抗p75<sup>NT</sup>R抗体、抗Rho GDI抗体、およびp75<sup>NT</sup>Rの細胞外ドメインを用いて実施した場合にも観察された。

#### 【0417】

(実施例6: サイレンサおよび/またはp75<sup>NT</sup>RとRho GDIとの間の相互作用を破壊する因子の、インビボにおける神経再生効果)

200gの雄のWistarラットを使用して、第9胸椎の椎弓切除術を行った後、脊髄の背側半分を切断した。持続浸透圧ポンプを用いて損傷部位へのTAT融合Pep5またはTAT-融合コントロールペプチドのいずれかの持続的な投与を行った。その結果、コントロールペプチドの場合と比較して、TAT-P

e p 5 を用いた場合に顕著な神経再生が観察された。

【0418】

同様の結果が、抗 p 7 5 N T R 抗体を用いて実施した場合にも観察された。

【0419】

(実施例 7：マウスにおける実証)

上記と同様の実験をマウスを用いて行ったところ、同様に、神経の再生が確認された。

【0420】

(実施例 8：改変アミノ酸)

同様の実験を P e p 5 の配列（配列番号 2）の C 末端にアラニンを付加したものの、p 7 5 の C 末端 10 残基を欠失させたものに対する抗体、配列番号 4 の 2 7 3-4 2 7 位のうち、4 2 3 位のアラニンをバリンに変更したもので行ったところ、同様に、神経の再生が確認された。

【0421】

神経に関連する疾患、障害および状態は、特に成体において再生が困難であるという特殊事情から、その治療についても根本的な治療が困難といわれてきた。しかし、本発明の上述のような効果によって、従来では不可能とされていた診断が可能となり、治療にも応用することができることが明らかとなった。したがって、本発明は、従来の診断薬でも医薬でも達成不可能であった有用性を有するといえる。

【0422】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【0423】

(引用文献)

引用文献 1. D e c h a n t , G. & B a r d e , Y. A. T h e n e u

rotrophin receptor p75 (NTR) : novel functions and implications for diseases of the nervous system. Nat Neurosci. 5, 1131-1136 (2002).

引用文献2. Yamashita, T., Tucker, K. L. & Barde, Y. A. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. Neuron 24, 585-593 (1999).

引用文献3. Davies, A. M. Neurotrophins: neurotrophic modulation of neurite growth. Curr. Biol. 10, R198-200 (2000).

引用文献4. Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. Genes Dev. 16, 1587-1609 (2002).

引用文献5. Yamashita, T., Higuchi, H. & Tohyama, M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. J. Cell Biol. 157, 565-570 (2002)

引用文献6. Wang, K. C. & Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R. & He, Z. p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. Nature 420, 74-78 (2002).

引用文献7. Wong, S. T. et al. p75 (NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated g

lycoprotein. Nat Neurosci. 5, 1302-1308 (2002).

引用文献8. Sasaki, T. & Takai, Y. The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. Biochem Biophys Res Commun. 245, 641-645 (1998).

引用文献9. Fournier, A. E., GrandPre, T. & Strittmatter, S. M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. Nature 409, 341-346 (2001).

引用文献10. Masuda, T. et al. Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. J. Biol. Chem. 269, 19713-19718 (1994).

引用文献11. Feinstein, D. L. & Larhammar, D. Identification of a conserved protein motif in a group of growth factor receptors. FEBS Lett. 272, 7-11 (1990).

引用文献12. Koch, G., Haberman, B., Mohr, C., Just, I. & Aktories, K. Interaction of mastoparan with the low molecular mass GTP-binding proteins rho/rac. FEBS Lett. 291, 336-40 (1991).

引用文献13. Takahashi, K. et al. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho

small G protein. J Biol Chem. 272, 23371-23375 (1997).

引用文献14. Yaku, H., Sasaki, T. & Takai, Y. The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: its properties in comparison with those of Smg GDS. Biochem Biophys Res Commun. 198, 811-817 (1994).

引用文献15. Ilag, L. L. et al. Selection of a peptide ligand to the p75 neurotrophin receptor death domain and determination of its binding sites by NMR. Biochem Biophys Res Commun. 255, 104-109 (1999).

引用文献16. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science 285, 1569-1572 (1999).

引用文献17. Bentley, C. A. & Lee K, F. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. J Neurosci. 20, 7706-7715 (2000).

引用文献18. Walsh, G. S., Krol, K. M., Crutcher, K. A. & Kawaja, M. D. Enhanced neurotrophin-induced axon growth in myelinated portions of the CNS in mice lacking the p75 neurotrophin receptor. J. Neurosci. 19, 4155-4168 (1999).

引用文献19. Lee, K. F., Bachman, K., Landis, S. & Jaenisch, R. Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. Science 263, 1447-1449 (1994).

引用文献20. McQuillen, P. S., DeFreitas, M. F., Zada, G. & Shatz, C. J. A novel role for p75NTR in subplate growth cone complexity and visual thalamocortical innervation. J Neurosci. 22, 3580-3593 (2000).

引用文献21. Del Pozo, M. A. et al. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. Nat Cell Biol. 4, 232-239 (2002).

引用文献22. von Schack et al. Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. Nat Neurosci. 4, 977-978 (2001).

引用文献23. Lee, K. F. et al. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. Cell 69, 737-749 (1992).

引用文献24. Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G. & Ibanez, C. F. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. EMBO J. 16, 4999-5005 (1997)

引用文献25. Ren, X. D. , Kiosses, W. B. & Schwartz, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. EMBO J. 18, 578-585 (1999) .

引用文献26. Forget, M. A. , Desrosiers, R. R. , Gingras, D. & Beliveau, R. Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. Biochem. J. 361, 243-54 (2002) .

引用文献27. Hart, M. J. , Eva, A. , Evans, T. , Aaronson, S. A. & Cerione, R. A. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. Nature 354, 311-314 (1991) .

引用文献28. Cai, D. , Shen, Y. , De Bellard, M. , Tang, S. & Filbin, M. T. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. Neuron 22, 89-101 (1999) .

【0424】

【発明の効果】

神経突起伸展の阻害に関連する p75<sup>NTR</sup> とその相互作用因子との関係を明らかにすることによって、神経の再生およびその神経の再生に基づいて神経学的疾患を処置するための薬学的組成物および方法が提供される。

## 【 0 4 2 5 】

(配列表の説明)

配列番号 1 : P e p ポリペプチドの核酸配列

配列番号 1 は、配列番号 2 で示す P e p ポリペプチドの縮重核酸配列である。

P e p 5 A A S e q u e n c e

C F F R G G F F N H N P R Y C

Cys Phe Phe ArgGly Gly Phe Phe Asn His Asn Pro Arg Tyr Cys

tgy tty tty mngngn ggn tty tty aay cay aay ccn mgn tay tgy

tgtttt cgtggt aatcat cct tat

tgcttc cgcggc aaccac ccc tac

cgagga cca

cggggg ccg

aga

agg

配列番号 1 : p e p 5 縮重 DNA

tgyttyttymngngnggnttyttaaycayaayccnmgntaytgy

配列番号 2 : P e p ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 3 : ヒト p 7 5 ポリペプチドの核酸配列

配列番号 4 : ヒト p 7 5 ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 5 : ヒト R h o G D I ポリペプチドの核酸配列

配列番号 6 : ヒト R h o G D I ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 7 : M A G ポリペプチドの核酸配列

配列番号 8 : M A G ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 9 : N o g o ポリペプチドの核酸配列

配列番号 1 0 : N o g o ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 1 1 : R h o A ポリペプチドの核酸配列

配列番号 1 2 : R h o A ポリペプチドのアミノ酸配列



配列番号 1 3 : p 2 1 ポリペプチドの核酸配列

配列番号 1 4 : p 2 1 ポリペプチドのアミノ酸配列

配列番号 1 5 : 実施例において使用されるコントロールペプチド

配列番号 1 6 : ラット p 7 5 ポリペプチドの核酸配列

配列番号 1 7 : ラット p 7 5 ポリペプチドのアミノ酸配列

【 0 4 2 6 】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> Trans-Science, Inc.

<120> Composition and method for neural regeneration

<130> J1-03519081

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Degenerate Sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

<223> "n" is A , C, G or T.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

<223> "n" is A , C, G or T.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(18)

<223> "n" is A , C, G or T.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (36)..(36)

<223> "n" is A , C, G or T.

<220>

<221> misc\_feature

<222> (39)..(39)

<223> "n" is A , C, G or T.

<400> 1

tgyttyttym gnggnggntt yttayaaycay aayccnmgntaytgy

45

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Sequence

&lt;400&gt; 2

Cys Phe Phe Arg Gly Gly Phe Phe Asn His Asn Pro Arg Tyr Cys

1

5

10

15

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3386

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

gccgcggcca gctccggcgg gcaggggggg cgctggagcg cagcgcagcgcagcccatc 60

agtccgcaaa gcggaccgag ctggaagtcg agcgctgccg cgggaggcgggcgatggggg 120

caggtgccac cggccgcgcc atggacgggc cgcgctgct gctgttgctgcttctggggg 180

tgtcccttgg aggtgccaag gaggcattgcc ccacaggcct gtacacacacagcggtgagt 240

gctgcaaagc ctgcaacctg ggcgagggtg tggcccagcc ttgtggagccaaccagaccg 300

tgtgtgagcc ctgcctggac agcgtgacgt tctccgacgt ggtgagcgcgaccgagccgt 360

gcaagccgtg caccgagtgc gtggggctcc agagcatgtc ggcgccgtgcgtggaggccg 420

acgacgccgt gtgccgtgc gcctacggct actaccagga tgagacgactgggcgctgcg 480

aggcgtgccg cgtgtgcgag gcgggctcgg gcctcgtgtt ctcctgccaggacaagcaga 540

acaccgtgtg cgaggagtgc cccgacggca cgtattccga cgaggccaaccacgtggacc 600

cgtgcctgcc ctgcaccgtg tgcgaggaca ccgagcgcca gctccgcgagtgcacacgct 660

gggccgacgc cgagtgcgag gagatccctg gccgttggat tacacgggtccacacccccag 720

agggctcgga cagcacagcc cccagcacc aggagcctga ggcacctccagaacaagacc 780

tcatagccag cacggtggca ggtgtggtga ccacagtgat gggcagctcccagcccgtgg 840

tgacccgagg caccaccgac aacctcatcc ctgtctattg ctccatcctggctgctgtgg 900

ttgtgggcct tgtggcctac atagccttca agaggtggaa cagctgcaagcagaacaagc 960

aaggagccaa cagccggcca gtgaaccaga cgccccacc agaggggagaaaaactccaca 1020

gcgacagtgg catctccgtg gacagccaga gcctgcatga ccagcagccccacacgcaga 1080

cagcctcggg ccaggccctc aagggtgacg gaggcctcta cagcagcctgccccagcca 1140

agcgggagga ggtggagaag ctctcaacg gctctgcggg ggacacctggcggcacctgg 1200

cgggcgagct gggctaccag cccgagcaca tagactcctt tacccatgaggcctgccccg 1260

ttcgcgccct gcttgcaagc tgggccaccc aggacagcg cacttgagcgcctcctgg 1320

ccgccctgcg ccgcatccag cgagccgacc tcgtggagag tctgtgcagt gagtccactg 1380

ccacatcccc ggtgtgagcc caaccgggga gccccgccc cgccccacattccgacaacc 1440

gatgctccag ccaaccctg tggagcccg accccaccc tttggggggggcccgccctgg 1500

cagaactgag ctctctggg caggacctca gagtccagcg cccaaaaccacagccctgtc 1560

agtgcagccc gtgtggcccc ttacttctg accacacttc ctgtccagagagagaagtgc 1620

ccctgctgcc tccccaaacc tgcccctgcc ccgtcaccat ctcaggccacctgccccctt 1680

ctcccacact gctaggtggg ccagcccctc ccaccacagc aggtgtcatatatggggggc 1740

caacaccagg gatggtacta gggggaagtg acaaggcccc agagactcag agggaggaat 1800

cgaggaacca gagccatgga ctctacactg tgaacttggg gaacaagggtggcatcccag 1860

tggcctcaac cctcccctcag cccctcttgc cccccaccc agcctaagatgaagaggatc 1920

ggaggcttgt cagagctggg aggggttttc gaagctcagc ccacccccctcatTTTtgat 1980

ataggctcagt gaggcccagg gagaggccat gattcgccca aagccagacagcaacgggga 2040

ggccaagtgc aggctggcac cgccttctct aaatgagggg cctcaggtttgcctgagggc 2100

gaggggaggg tggcaggtga ccttctggga aatggcttga agccaagtcagctttgcctt 2160

ccacgtgtc tccagacccc cacccttcc cactgcctg cccacccgtg gagatgggat 2220

gcttgccatg ggcctggctc atgatggagt caggtttggg gttcgtggaaagggtgctgc 2280

ttccctctgc ctgtccctct caggcatgcc tgtgtgacat cagtggcatggctccagtct 2340

gctgccctcc atcccgacat ggacccggag ctaacactgg ccctagaatcagcctaggg 2400

gtcagggacc aaggaccctt cacttgcaa cacacagaca cagcacacacacacacagg 2460

aggagaaatc tcacttttct ccatgagttt tttctcttgg gctgagactggatactgccc 2520

ggggcagctg ccagagaagc atcggaggga attgaggtct gctcggccgtcttccactgc 2580

ccccgggttt ggcgggccaa ggactgccga ccgaggctgg agctggcgtctgtcttcaag 2640

ggcttacacg tggaggaatg ctccccatc ctccccttcc ctgcaaacatggggttggct 2700

gggcccagaa ggttgcgatg aagaaaagcg ggccagtgtg ggaatgcggcaagaaggaat 2760

tgacttcgac tgtgacctgt ggggatttct ccagctcta gacaaccctgcaaaggactg 2820

ttttttcctg agcttggcca gaagggggcc atgaggcctc agtggactttccaccccctc 2880

cctggcctgt tctgttttgc ctgaagttag agtgagtgtg gctcccctctatitagcatg 2940

acaagcccca ggcaggctgt gcgctgacaa ccaccgctcc ccagcccagggttccccag 3000

ccctgtggaa gggactagga gcactgtagt aaatggcaat tctttgacctcaacctgtga 3060

tgaggggagg aaactcacct gctggcccct cacctgggca cctggggagtgggacagagt 3120

ctgggtgtat ttattttcct cccagcagg tggggagggg gtttggtggcttgcaagtat 3180

gttttagcat gtgtttggtt ctggggcccc ttttactcc ctttgagctgagatggaacc 3240

cttttgccc ccagctgggg gccatgagct ccagaccccc agcaaccctcctatcacctc 3300

ccctccttgc ctctgtgta atcatttctt gggccctcct gaaacttacacacaaaacgt 3360

taagtgatga acattaaatagcaaag 3386

<210> 4

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu  
1                      5                      10                      15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys  
                    20                      25                      30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn  
                    35                      40                      45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys  
50                      55                      60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr  
65                      70                      75                      80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser  
                    85                      90                      95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly  
100                      105                      110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys



115

120

125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr

130

135

140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His

145

150

155

160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln

165

170

175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro

180

185

190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr

195

200

205

AlaPro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile  
210 215 220

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln  
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys  
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe  
260 265 270

Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg  
275 280 285

Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp  
290 295 300

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His  
305 310 315 320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr

325

330

335

SerSer Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn

340

345

350

Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr

355

360

365

Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg

370

375

380

Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala

385

390

395

400

Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser

405

410

415

Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val

420

425

<210> 5

<211> 1921

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggcacgaggg ggcggccgac gacgttcgtc atttagtgcg ggagggatcctgaaccgcgc 60

ggccgaaccc tccggtgtcc cgaccagggc taagcttgag catggctgagcaggagccca 120

cagccgagca gctggcccag attgcagcgg agaacgagga ggatgagcactcggtaact 180

acaagcccc ggcccagaag agcatccagg agatccagga gctggacaaggacgacgaga 240

gcctgcgaaa gtacaaggag gccctgctgg gccgcgtggc cgtttccgcagaccccaacg 300

tccccaacgt cgtggtgact ggctgaccc tgggtgtgcag ctggccccgggccccctgg 360

agctggacct gacgggcgac ctggagagct tcaagaagca gtcgtttgtgctgaaggagg 420

gtgtggagta ccggataaaa atctctttcc gggttaaccg agagatagtgtccggcatga 480

agtacatcca gcatacgtac aggaaaggcg tcaagattga caagactgactacatggtag 540

gcagctatgg gccccgggcc gaggagtacg agttcctgac ccccgaggaggagggcaccca 600

agggtatgct ggccccggggc agctacagca tcaagtcccg cttcacagacgacgacaaga 660

ccgaccacct gtctggggag tggaatctca ccatcaagaa ggactggaaggactgagccc 720

agccagaggc gggcagggca gactgacgga cggacgacgg acaggcggatgtgtccccc 780

cagccccctcc cctccccata ccaaagtgtgacagggccct ccgtgccccctcccaccctgg 840

tccgcctccc tggcctggct caaccgagtg cctccgaccc ccctcctcagccctccccc 900

cccacaggcc cagcctcctc ggtctcctgt ctcgttgctg cttctgcctgtgctgtgggg 960

gagagaggcc gcagccaggc ctctgctgcc ctttctgtgc cccccaggttctatctcccc 1020

gtcacacccg aggcctggct tcaggaggga gcggagcagc cattctccaggccccgtggt 1080

tgcccctgga cgtgtgcgtc tgctgctccg ggggtggagct ggggtgtgggatgcacggcc 1140

tcgtggggggc cgggccgtcc tccagccccg ctgctccctg gccagcccccttgctgctgt 1200

cgttcccgtc taaccatgat gccttaacat gtggagtgtg ccgtggggcctcactagcct 1260

ctaactccct gtgtctgcat gagcatgtgg cctccccgtc ctttccccggtggcgaaccc 1320

agtgaccag ggacacgtgg ggtgtgctgc tgctgtccc cagcccaccagtgcctggcc 1380

agcctgcccc cttccctgga cagggctgtg gagatggctc cggcggcttg gggaaagcca 1440

aattgcaaaa actcaagtca cctcagtacc atccaggagg ctgggtattgtcctgcctct 1500

gccttttctg tctcagcggg cagtgccag agcccacacc cccccaagagccctcgatgg 1560

acagcctcac ccaccccacc tgggcccagc caggagcccc gcctggccatcagtatttat 1620

tgcctccgtc cgtgccgtcc ctggggccact ggcttggcgc ctgttccccaggctctcag 1680

tgccaccacc cccggcaggc cttccctgac ccagccagga acaaacaagggaccaagtgc 1740

acacattgct gagagccgtc tcctgtgcct ccccgcccc atccccgggtcttcgtgttgt 1800

gtctgccagg ctcaggcaga ggcgcctgtc cctgcttctt ttctgaccgg gaaataaatg 1860

cccctgaagg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1920

a 1921

<210> 6

<211> 204

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Glu Gln Glu Pro Thr Ala Glu Gln Leu Ala Gln Ile Ala Ala

1

5

10

15

Glu Asn Glu Glu Asp Glu His Ser Val Asn Tyr Lys Pro Pro Ala Gln

20

25

30

LysSer Ile Gln Glu Ile Gln Glu Leu Asp Lys Asp Asp Glu Ser Leu

35

40

45

Arg Lys Tyr Lys Glu Ala Leu Leu Gly Arg Val Ala Val Ser Ala Asp

50

55

60

Pro Asn Val Pro Asn Val Val Val Thr Gly Leu Thr Leu Val Cys Ser

65

70

75

80

SerAla Pro Gly Pro Leu Glu Leu Asp Leu Thr Gly Asp Leu Glu Ser

85

90

95

Phe Lys Lys Gln Ser Phe Val Leu Lys Glu Gly Val Glu Tyr Arg Ile

100

105

110

Lys Ile Ser Phe Arg Val Asn Arg Glu Ile Val Ser Gly Met Lys Tyr

115

120

125

Ile Gln His Thr Tyr Arg Lys Gly Val Lys Ile Asp Lys Thr Asp Tyr

130

135

140

Met Val Gly Ser Tyr Gly Pro Arg Ala Glu Glu Tyr Glu Phe Leu Thr  
145 150 155 160

Pro Val Glu Glu Ala Pro Lys Gly Met Leu Ala Arg Gly Ser Tyr Ser  
165 170 175

Ile Lys Ser Arg Phe Thr Asp Asp Asp Lys Thr Asp His Leu Ser Trp  
180 185 190

Glu Trp Asn Leu Thr Ile Lys Lys Asp Trp Lys Asp  
195 200

<210> 7

<211> 2475

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

cagaagccag accatccaac cttctgtatc agtgctcctc gtcgcctcactgtacttcac 60

ggaagagact tggttgactg gccacttgga gcggaatcag gagacattcccaactcaggg 120

agactgaggt gagggcccta gctcgccac ttgctggaca agatgatattccttaccacc 180

ctgcctctgt tttggataat gatttcagct tctcgagggg ggcaactggggtgcctggatg 240



ccctcgcca tctcagcctt cgagggcacg tgtgtctcca tcccctgccgtttcgacttc 300

ccggatgagc tcagaccggc tgtggtacat ggcgctctggt atttcaacagtcctacccc 360

aagaactacc cgccagtggc cttcaagtcc cgcacacaag tggccacgagagcttccag 420

ggccgtagcc gcctgttggg agacctgggc ctacgaaact gcacctgct tctcagcacg 480

ctgagccctg agctgggagg gaaatactat ttccgagggtg acctgggcggctacaaccag 540

tacaccttct cggagcacag cgtcctggac atcatcaaca cccccaacatcgtgggtgccc 600

ccagaagtgg tggcaggaac ggaagtagag gtcagctgca tggcgccggacaactgcccc 660

gagctgcgcc ctgagctgag ctggctgggc cagcaggggc taggggagcccactgttctg 720

ggtcggctgc gggaggatga aggcacctgg gtgcaggtgt cactgctacacttcgtgcct 780

actagagagg ccaacggcca ccgtctgggc tgtcaggctg ccttccccaacaccaccttg 840

cagttcgagg gttacgccag tctggacgtc aagtaccccc cgggtgattgt ggagatgaat 900

tcctctgtgg aggccattga gggctcccat gtcagcctgc tctgtggggctgacagcaac 960

ccgccaccgc tgctgacttg gatgcgggat gggatggtgt tgagggaggcagttgctgag 1020

agcctgtacc tggatctgga ggaggtgacc ccagcagagg acggcatctatgcttgcctg 1080

gcagagaatg cctatggcca ggacaaccgc acggtggagc tgagcgtcatgtatgcacct 1140

tggaagccca cagtgaatgg gacggtggtg gcggtagagg gggagacagtctccatcctg 1200

tgttccacac agagcaaccc ggaccctatt ctcaccatct tcaaggagaagcagatcctg 1260

gccacggtca tctatgagag tcagctgcag ctggaactcc ctgcagtgcgcccaggagac 1320

gatggggagt actggtgtgt agctgagaac cagtatggcc agagagccaccgccttcaac 1380

ctgtctgtgg agtttgctcc cataatcctt ctggaatcgc actgtgcagcggccagagac 1440

accgtgcagt gcctgtgtgt ggtaaaatcc aaccgggaac cctccgtggcctttgagctg 1500

ccttcccga acgtgactgt gaacgagaca gagagggagt ttgtgtactcagagcgcagc 1560

ggcctcctgc tcaccagcat cctcacgctc cggggtcagg cccaagccccacccgcgctc 1620

attgtacct ccaggaacct ctacggcacc cagagcctcg agctgcctttccaggagca 1680

caccgactga tgtgggcca aatcggccct gtgggtgctg tggtcgcctttgccatcctg 1740

attgccattg tctgctacat caccagaca agaagaaaaa agaacgtcacagagagcccc 1800

agcttctcag cgggagacaa ccctcatgtc ctgtacagcc ccgaattccgaatctctgga 1860

gcacctgata agtatgagag tgagaagcgc ctgggggtccg agaggaggctgctgggcctt 1920

aggggggaac cccagaact ggacctcagt tattcccact cagacctggggaaacgaccc 1980

accaaggaca gctacaccct gacagaggag ctggctgagt acgcagaaatccgagtcaag 2040  
tgaggaagct gggggctggc cctgtggctc acccccatc aggaccctcgcttggccccc 2100  
actggccgtg ggctcccttt ctcttgagag tggtaggggt gggggcgggaaggggcgggg 2160  
caggaaacag tgaggtctta gggggccggc ctcccctcct tcccggctgctcctctctgc 2220  
caacatcctg cacctatgtt acagctccct ctcccctcct tttaacctcagctgttgaga 2280  
ggggtgctct gtctgtccat gttatttatt gttatcctgg tctcctgtccccttaccggg 2340  
ccccaggacc tgtacaaaag ggacatgaaa taaatgtcct aatgacaagtgccagtctag 2400  
accatcctt tggaggaaag gggcatatta gtaatacttt tctcgttgctgtaacaaaat 2460  
actggacaaaaacac 2475

<210> 8

<211> 626

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Met Ile Phe Leu Thr Thr Leu Pro Leu Phe Trp Ile Met Ile Ser Ala

1

5

10

15

Ser Arg Gly Gly His Trp Gly Ala Trp Met Pro Ser Ser Ile Ser Ala

20

25

30

Phe Glu Gly Thr Cys Val Ser Ile Pro Cys Arg Phe Asp Phe Pro Asp

35

40

45

Glu Leu Arg Pro Ala Val Val His Gly Val Trp Tyr Phe Asn Ser Pro

50

55

60

Tyr Pro Lys Asn Tyr Pro Pro Val Val Phe Lys Ser Arg Thr Gln Val

65

70

75

80

Val His Glu Ser Phe Gln Gly Arg Ser Arg Leu Leu Gly Asp Leu Gly

85

90

95

Leu Arg Asn Cys Thr Leu Leu Leu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Leu Gly

100

105

110

Gly Lys Tyr Tyr Phe Arg Gly Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Gln Tyr Thr

115

120

125

Phe Ser Glu His Ser Val Leu Asp Ile Ile Asn Thr Pro Asn Ile Val  
130 135 140

Val Pro Pro Glu Val Val Ala Gly Thr Glu Val Glu Val Ser Cys Met  
145 150 155 160

Val Pro Asp Asn Cys Pro Glu Leu Arg Pro Glu Leu Ser Trp Leu Gly  
165 170 175

His Glu Gly Leu Gly Glu Pro Thr Val Leu Gly Arg Leu Arg Glu Asp  
180 185 190

Glu Gly Thr Trp Val Gln Val Ser Leu Leu His Phe Val Pro Thr Arg  
195 200 205

Glu Ala Asn Gly His Arg Leu Gly Cys Gln Ala Ala Phe Pro Asn Thr  
210 215 220

Thr Leu Gln Phe Glu Gly Tyr Ala Ser Leu Asp Val Lys Tyr Pro Pro  
225 230 235 240

Val Ile Val Glu Met Asn Ser Ser Val Glu Ala Ile Glu Gly Ser His  
245 250 255

Val Ser Leu Leu Cys Gly Ala Asp Ser Asn Pro Pro Pro Leu Leu Thr  
260 265 270

Trp Met Arg Asp Gly Met Val Leu Arg Glu Ala Val Ala Glu Ser Leu  
275 280 285

Tyr Leu Asp Leu Glu Glu Val Thr Pro Ala Glu Asp Gly Ile Tyr Ala  
290 295 300

Cys Leu Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Asp Asn Arg Thr Val Glu Leu  
305 310 315 320

Ser Val Met Tyr Ala Pro Trp Lys Pro Thr Val Asn Gly Thr Val Val  
325 330 335

Ala Val Glu Gly Glu Thr Val Ser Ile Leu Cys Ser Thr Gln Ser Asn  
340 345 350

Pro Asp Pro Ile Leu Thr Ile Phe Lys Glu Lys Gln Ile Leu Ala Thr

355

360

365

Val Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Leu Glu Leu Pro Ala Val Thr Pro

370

375

380

Glu Asp Asp Gly Glu Tyr Trp Cys Val Ala Glu Asn Gln Tyr Gly Gln

385

390

395

400

Arg Ala Thr Ala Phe Asn Leu Ser Val Glu Phe Ala Pro Ile Ile Leu

405

410

415

Leu Glu Ser His Cys Ala Ala Ala Arg Asp Thr Val Gln Cys Leu Cys

420

425

430

Val Val Lys Ser Asn Pro Glu Pro Ser Val Ala Phe Glu Leu Pro Ser

435

440

445

Arg Asn Val Thr Val Asn Glu Thr Glu Arg Glu Phe Val Tyr Ser Glu

450

455

460

ArgSer Gly Leu Leu Leu Thr Ser Ile Leu Thr Leu Arg Gly Gln Ala  
465 470 475 480

Gln Ala Pro Pro Arg Val Ile Cys Thr Ser Arg Asn Leu Tyr Gly Thr  
485 490 495

Gln Ser Leu Glu Leu Pro Phe Gln Gly Ala His Arg Leu Met Trp Ala  
500 505 510

Lys Ile Gly Pro Val Gly Ala Val Val Ala Phe Ala Ile Leu Ile Ala  
515 520 525

Ile Val Cys Tyr Ile Thr Gln Thr Arg Arg Lys Lys Asn Val Thr Glu  
530 535 540

Ser Pro Ser Phe Ser Ala Gly Asp Asn Pro His Val Leu Tyr Ser Pro  
545 550 555 560

Glu Phe Arg Ile Ser Gly Ala Pro Asp Lys Tyr Glu Ser Glu Lys Arg  
565 570 575



Leu Gly Ser Glu Arg Arg Leu Leu Gly Leu Arg Gly Glu Pro Pro Glu  
 580 585 590

Leu Asp Leu Ser Tyr Ser His Ser Asp Leu Gly Lys Arg Pro Thr Lys  
 595 600 605

Asp Ser Tyr Thr Leu Thr Glu Glu Leu Ala Glu Tyr Ala Glu Ile Arg  
 610 615 620

Val Lys  
 625

<210> 9

<211> 60615

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

aaaaagcagc tagacctgga ggagacatcc ctgggagggg ctcccaggccaacagccaga 60

caaacattca gaatttttgg tgggtaggtc cagtgttttc acagcatgcgctacacatgg 120

ctttctgtgg cctctcagta gggcatgagt gagaccatac ctagcatagtcttcaagagc 180

atggtctggc cgggcagtag tggggcacgc ctttaatccc agcccttgagaaagcagagg 240

caggcagatt tctgagttca aggccagcct ggtctacaga gtgagttccaggacagccag 300

ggctatacag agaaaccctg tctctgtaaa aacaaaacaa aacaaacaaacaaacaaaaa 360

aagagaacat ggtctgtacc tccttcttac ctttagcctc cgaaagtctgagctgttctt 420

atactactgt ggccaatgca tcctcttctg gaatctgcag ttatgacatcggaagtttgg 480

agaaggccag aagctgctcc tcaggttttt ctggcttctt gtggagacagcctgactttt 540

cccagggctg gttaaaccba aacatgtttt gtttagctgc ttctagacctgggtttgctt 600

gctggatggc agaacaaact gccaatcaca agttcttggt caagaagaagtaattaagaa 660

actcgatggt ctggccgggc agtagtgggg cacgccttta atcccagccc ttgagtaagc 720 .

agaggcaggc agatttctga gttcaaggcc agcctggtct acagagtgagttccaggaca 780

gccagggcta tacagagaaa ccctgtctct gtaaaaacaa aacaaaacaaacaaacaaac 840

aaaaaaagag aacatggcct gtacctcctt cttaccttta gcctcccaaagtctgagctg 900

ttcttatact actgtggcca atgcacctc ttctggaatc tgcagttatgacatcggaag 960

tttggagaag gccagaagct gctcctcagg ttttctggc ttcttgtggagacagcctga 1020

cttttccag ggctgggttaa acccaaacat gttttgttta gctgcttctagacctgggtt 1080

tgcttgctgg atggcagaac aaactgccaa tcacaagttc ttgttcaaga agaagtaatt 1140

aagaaactcg aggaagaaat gggatatacgg gtctgggcac tatcttgctggcactcagaa 1200

catgttcaag atagcttcta ccaggcagca ttcagagccc atcacttcaggtagcagaat 1260

gggggcctgg aaggtgttta tgaccaggaa cctatgcctg agcctgcaatcaagccagga 1320

gttgtagttg ggatgcctct taccactgag catcaaacag tagttgaaggccttttcctg 1380

ctttggcagg aacagtggta actattggta aatagcctat gtggggcctggtaccaggt 1440

tactgagcaa gctacttatt caattctgcc ctggtttcct taaaagaataccaggttgcc 1500

tgcccataa tagtgactga gatgttgggc catattcaga tccctgagaatgggtcacatg 1560

atggctagcg caggcttctg ctcagatctg cccatagaaa cttgactttaagaagcctca 1620

gcttcttagg cttcccagaa tgcacatggg gcaggacata tcaattagggtagaggtctt 1680

ctttctctta ccatgtactg tgcaatgagg gcctggcctt cactatccagtgtgggaaga 1740

tcctctttgg tgaactcatt tgtgtttctg aagcaatgga catccctgttctggatggca 1800

gaccgaccac tcaggacttc agcagccact ggagcagtgc aatctttacagttactgctg 1860

atatggaaac aggagtcctt gctcgcaaca acagctagga atattcactgttagtatatc 1920

attgggcctt ctggtctcct ggagacggac aatatcagca tccagtttgttcaaaatgtg 1980

tctcagggcc atgggtcagt ggctactttc ctggaaaccc aacccttatatgagcttcat 2040

tgatggtcct gggttattaca catgacatTT agcacaggTg gattgtcacagggaagtTga 2100

caaagcttca tacatcatag caggacgTTt ttgggtTTTT tgtttgtttgtttgtttTgt 2160

TTTTTgaga cagggtttct ctgtgcagTc ctggctgtcc tggaactcactctgtagacc 2220

aggctggTct tgaactcaga aatccacTg cctctgcctc ccaagtgcaggacttcttct 2280

gtattctcca tTcatctgtt ggtagatatg taaatagcca tttcctggctatttggatag 2340

tgggattcct tttcctgact taaattttta ttttaggtcc aacactaattataaacatgg 2400

ctgaagaaat tgatctcatt tctgttttta ctcttagtag tgaatgaatgtactttgaac 2460

caagacatTT attaaccagg attacaaagc tacatttcat aaaattctatatatacagaa 2520

cctaaaacca gggaagtgtt aggggaaatc atgcaggaag ctgttaaaacttccacttag 2580

gccaaaatta tgtttcagTg ttttgTTTT ttccagtaca aagaatgcatgtaactcagc 2640

agtgcactTg aaaaaagaca agtccttttc agtaggtgaa agagctatggcagaaagctc 2700

ttgaaacagg ttttatgtTg gaacccatct tTcatattcc aatatatatgcaaatatata 2760

tccatttctg gccctttaac tttttcaaag ggcatacatg atagaaggcaaagttagcct 2820

gttccacata tgagtttagg cagtgattaa gtgttttgca atagtattaataccatagca 2880

ctggaactgc ctattcttct gagtagtgac ccttccitta cctgaaaatgtatagacaaa 2940

ctttgcaact gctttgtttg gtgctggtat agagtacata cctaatacat tgtataaacc 3000

aataaagcat aaaatgcaaa cacagaatgg atgatagctc aagaaacttttgctatgtaa 3060

tgaatcacct aaaaaggcag tggtttataaa caacagtgac acattatttttcatgattgt 3120

atattggctc taggatgaag tcgcattttt tgagagaata tcactatggctgggatagtt 3180

aggtgtctct ttcaatgtct cttttcttcc agaataaata ggaccagaatgtgtatgaat 3240

gctatgcggt gtatatgtgg gacaccacgc aggtgcctgg ctcctgaggaagtcatagag 3300

ggcttcatat ttgctggaac tggagttagt gagagttaga aatcacatgttaggtcctta 3360

gactcaaact tgggctgttt atttactgca agagcagtaa gttctcttaa ctagccatct 3420

ttctagcccc attacatttt aaaagttttt tttaaaaaaa gatgtgtgtgagtgtgtatg 3480

ctgtgattat gagctgcttg gatgctggga acagaactca ggtcttggttaaagccatttc 3540

tccagcaacc cttcaccaac atcccccccc cacctaattc tttcttaaaacttaaaactaa 3600

atctagggtg atattacttt gttgggacta cgaatttgct taaaaaccaacaaaatccat 3660

ggcaatcaaa tatcttagtt attagaacat gcatttaaaa gtttctacaagctgcttcaa 3720

aaagaataca agtgaacttg ataatatagt gtactcatcc cactatatccaaaatactat 3780

caatgccaac ataaaaccaa tgtgaacag aaattataac atttcttata aattctggga 3840

atgtagtggtg tattttattc acagaacaca cttcatttca gtgctcaggagctaaaagca 3900

gccagttgct tcagtactag acagtgacaca thtagactga acaattggaatgcaggcaat 3960

cctctctcca gagtaggcat gcagccagta tttttgaaaa gtgtataagaaagataaaaag 4020

gactctgcaa atcttgaagc aaagttttct atgttctacc gttttctttctttctttctt 4080

tctttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt tctttctttctttctttctt 4140

tctttctttc tttctttctt tctttctttc tttctttctt tctttctttctttctttctt 4200

tcgatttttt gaaacagggt ttctctgtgt agctttggct gtcctagaattcactttgta 4260

gaccaggctg gcctcgaact cagaaatcca cctgcctctg catcccaagtgtctgggatta 4320

aaggcatgtg ccaccacacc tggctaccgt tttctttaaa gtgtagctttgggggggtgg 4380

gggtgggggg gaccgcacat caggagacat gccattccag catatcaaaccagtgagtgt 4440

agggcttccc gactcctagg aagcctgaat catccgggat gttgactcatcagcctgagg 4500

tgagtgaaaa atagtgaacc aattttgcct tccaaggcat ctatttcaacgttccttccc 4560

ccttctccct ttctggtgac tcattctccg tgcactttta gaggccagcagaatgcaagg 4620

ccgaaagcat tctaaacagt gagcccagag ctccgggtaa tctagcacagctgttttgcc 4680

tacctcattc caggcctgca gtctagaaag ggagggaact tgaaagtgtcaaataaatgt 4740

tttgtttttc tttctccttt tgaggtggtg gtagttatgc gttgggaccatgtctgaaaa 4800

taagtctttt atttaaaaaa atccgtaaga cctaattcag tcttgtagtacctttctcc 4860

actttttttt tttttttccc ttttcgggga ggaaactttc cactcctaggtccccaggat 4920

aacgcccttc cacaggcttc ttggaaaact ctccgaatcc tggggccgcagccccgcccc 4980

tttggtaga ctaaaatccc gctgtaggca aggccaagtc cccgccccattccccaaacta 5040

cactaggtgg ggggtggatcc cagctccaaa tcccgccttc cgaacgccgccaaggaagta 5100

tggcaggctc cgcctgcacc ctatttctat tggacaagcc cgtgatccatctttctctatc 5160

ccgcagccta ttggctctct gtcccccgcg ccagccaagc cctcccctgccgggaaggtg 5220

agtcacgcca aactgggcgg agagtctgct ggcctctctc agttgctcatctgggcgggc 5280

ggcggctgct gcaactgagg acagggcggg tggcgcatct cgagcgcgaggcaggagga 5340

gaagtcttat tgttcctgga gctgtgcct ttgcgggttc ctcggttggttcggccagc 5400

ccggcctctg ccagtcctgc ccaaccccca caaccgcccg cggctctgaggagaagtggc 5460

ccgcggcggc agtagctgca gcatcatcgc cgaccatgga agacatagaccagtcgtcgc 5520

tggtctcctc gtccgcggat agcccgcgcc ggccccgcc cgctttcaagtaccagttcg 5580

tgacggagcc cgaggacgag gaggacgagg aagacgagga ggaggaggaggacgacgagg 5640

acctggagga attggaggtg ctggagagga agcccgacgc cgggctgtcc gcggctccgg 5700

tgccccccgc cgccgcaccg ctgctggact tcagcagcga ctcggtgccccccgcgcccc 5760

gcggggccgct gccggccgcg cccccaccg cccctgagag gcagccgtcctgggaacgca 5820

gccccgcggc gtccgcgcca tccctgccgc ccgctgccgc agtcctgccctccaagctcc 5880

cggaggacga cgagcctcca gcgcggcctc cggcgccagc cggcgcgagccccctagcgg 5940

agcccgccgc gcccccttcc acgccggccg cgcccaagcg caggggctcgggctcagtgg 6000

gtgagtgtg ctgcgcgtta cgccccctccc tcttttgtgt cttggcccgggggaggtggg 6060

gacgggcagg gctgctcggg accctagggc tttgtctacg agtggcaggg tgatggcgcc 6120

cccgtggcg ggaggcgggc agaaggggtg ggcggcctcg gaagcctgggtgccttcatt 6180

gtttgtcggg gtttcgggga gcacgtgcac cgctgccaag tcgctggttcccattccagc 6240

acgaagttct cgcctatcag cagctaggag tgtgttgaag aactaggatggtggattcct 6300



tgggctgggc tgggctgggc tgggctgggc ttggaggtgg gaatgggaaggctgtggtgc 6360

cctaataccct ttatttaaag gatgggcgtt tgtcgaccac tctacagtttttttattttt 6420

tagggcctgc cttccttcct gccgggcgtc gggggatccc ctgcaactaatccccctgttt 6480

ctttctccct ttattggtgg ggaactggcc gagctgctaa cgtctatacagtaaccaaac 6540

tgcggtgaag ggggagcgag cgcctccagt ggcgtggttc caggagaaaagggaaggaga 6600

gacttttggg gaagtctgc caccgccag ttcatattgt ttaatgtggtgattcctac 6660

accagcctga gaaacgagat ctgggcattt tgttccgatg gggcatagttatccagggcc 6720

tcagttgtgc tgtaaaagaa attgccaaat ttaatggcat ctcttagcctttaaatgcat 6780

cgagattgac ttgtagagaa aaggcaaaat ggttgacctt aaaaaggggcaaacctgtgg 6840

attcctggtc aggaattagt tgaacttggt gtagatttat cctgagacataatgaaaatg 6900

ttttagggca aatgttccta tattagttag aagtttttat aagtatatgatttacattga 6960

caaaatgcat tgaatattgt ttattgccc tttttatttt ggaaagggaaaaaatcaaat 7020

tttataaaga acgagaatgc atcttaagta gtttattact ttgggacaaagtgtcttgct 7080

agcaaaaagc cttttttttc tttttgtaa gtaaggtaaa aaattaaatggtataactgc 7140

ctgctgggaa attttcacaa cattccagat ctaggaggtt ttatttttttagagaaataa 7200

tatcacccca gagcttgcag tatctttttt attacaatta actcttttataatggggata 7260

atgaatcaat agaagtgttc ctgggtaaca attcattatg ggcacactcaaaggcactat 7320

tcaaaaacaa ctcttacagt taaagaattt agatgaagac tgccttgtcttttcattttt 7380

attttccttt cttttttttg agggaaacta aagtagaaaa aaagtaagtattaaaatttt 7440

aaactggaaa caatgattgg ccaaactata cttttcattt tttctactttcatagaaaca 7500

agataaatag ttttgtcctt tgaatattga ggggactcag gcagcatcagcattttcttg 7560

aaatactgac aaattttaga agatttagaa atactaacia agtttagaagacaaaaaagg 7620

aatgttgtct acccaggaat tttgtactca ttgtgttttt tggaagctttattcccttta 7680

ttgaacacia caacagtgag ttgtgggtcat tgatagttaa ctcatcgcaatacattagat 7740

ttcttaatgc actgaagagt ttggctattg gctgggtcct attattggttacctaggaca 7800

ctttaciaag ttctgggctt ccaaggtgtg gcagtaagca agactcatgctcccctcatg 7860

gggataatac acaaaataag cacacaaaaa agtactaaaa atgatgggtgttatgaaacga 7920

taacagcttg aagggatgag aataactgaa acatgtgtac ctttttttttcctttcttaa 7980

aatctattt attttatgta tatgagtaca ctgtagctgt cttcagacacatcagaagag 8040

ggcatcagat cccattgcag atggttgtga gccaccatgt ggttgctgggaattgattga 8100

actcaggatc tctggaagag cagtcagtgc tcttaaccgc tgggccatctctccagcccc 8160

atgaggaccc ttttcaaggt tgcttgatga taggaaaaag aactaaggtttgagctgcag 8220

agaaaaaaaa atatataaa aggaattcct agggcaaaga ccctgaagcaggagtgcagct 8280

tgtttattaa ctaagattat taaggaaaac ttatgcagag tcaggtaattaggagcctct 8340

ggggtcacgg taaaaagtat ggcttaaaga aatagtattt taggaatatg ctacttgaat 8400

aattacattg tgattttgga gcaaaaatgt agctttgaag gtttatagatgattagaata 8460

aagacaaagg tgaaagcact ctgtccatgg ttagaataga caaactgggagaggctatat 8520

ataaacccct agcaactgtg tttaacactg ctatttacat tagtttttttccttaactct 8580

gatatccttc agttagtaag ttatagtttt cctgaattgc agtatctccattgtaatgta 8640

ttgagacctg taccttttac ttgatgacca tttttctaga aagaatgggttcatttgttct 8700

aaggaaactt agagattgat ttgaggaaag tgcagacatc agttgaccatttttctagaa 8760

agaatggttc atttgttcta aggaaactta gagattgatt tgaggaaaagt gcagacatca 8820

gttaagatga ctaagctgat cttagacac attggtaatg tgaatgaaagtgtgtgatag 8880

attaactgga attctgaagg gtattaagtc aaaataaagg aatctggatcttattatcat 8940

actttaattc atagtctgcc gtgtcaagct gcttttatat catgaaatcaaaatggttct 9000

tcccaaaaaa aaaaaaaaaa aagattttgtg tgcgtgcaca ggccagaaacaggagggtat 9060

ctctcttggt gagtacagat atttagatgt tggatatccag cttgataatgagattttatg 9120

agttgggttag tctgttttgt ttcgtttcaa aagaaaaaag atttatcaagcttctggtga 9180

tgggtggttc aaggcatggc atctgtcatc tacttggccg aggtaaaaacctttagata 9240

atgtcacagt ggtgagagcc tggactagag gaccacaatt acatggtgagacaaggaacc 9300

tgggaggaag taggaaccag tcttggcctt ttataacat catcttgtgagaactcaggt 9360

tctagtagaa cctttattct tcctgggatt acaaccaga ttacaaccacttcccagtag 9420

gctgttctct ttttgtccct gggatttgaa ttgatggcct tgtgttctatagtgaagcca 9480

ctactgactg actcacttct ccaacctctc cacttttaat attaatgtaagtcttttat 9540

tttgtgactt ggggggtcttt ctgccacagc ttattgaata tctggaattacaggtttggg 9600

tatacaggcc cacctgtggg cccacttct taaagatatg attatctattgatgtagaca 9660

tgtgggagcc aagctctgta tagtatTTTT gaacagtact gaagtaatgccaaaaatacc 9720

ttttcattag cttttctaag ttgtactctt gcagattgta cctgttggaagtgtcttgac 9780

tatctgtcta cagttctgtg gaatggcatt tatgtgtgtg taccttttccattttgtacc 9840

aaagtgtctg cagaggtccg ggggatatgg ttcagtcgta gagcattgcctcaaggattc 9900

caagtcaggg gtttgatttt tagcattgga aaaaacactg ctatccacatgcccccaactg 9960

atcaaacaaa caaatagatg cagagaattc cacagacata tagcccagta gtcctcatct 10020

ctgatttcac tttgtgaatt tcattacttt atgttaaaag aggctaagtg gaaagattcc 10080

aggaatagct cattagcttt aaattatatg ttgatctgat tagggtgata aattatccct 10140

ttcccaatgt atccatgctg tctgtgttgt acctcccatt ttgtctcttt gttaggagaa 10200

aaactagtga cttcaaata gcttatattt aaatgagcat taaagtaatg agattggcaa 10260

agcttttaaaa ttacttcctt tgattgaaac atgaaaattt atcataagtg tatttgtata 10320

tggaagaaaa tcagtttatt tcgggtttat ttactgtgct ttcaagagtc cactgttatc 10380

tggggatata cctcctggtt gatggaggag aatccgtgac ctttatttca ctttaataatg 10440

accccaaagt gcaaaagtag tttatctaag ctttatcata ggtgtgtggt ataggcaaag 10500

agtatgtatg gagtttaata ctatttcaat tgcagggtgc ctctggcaat agtaaaaaaa 10560

aaaaaaagga tctcatgaat aagagaactg ctgtatttaa tctcttctgc tctggtagtt 10620

atgtagatta gcctttcctg ttacaaacag tgttgctatg aacaccttta ggtattattt 10680

ccttggagat gaatgctgaa gggttcactg tagggttgta gaataaatcc attcaggtaa 10740

gatttctagt tcaaaaggag cttgtataca acgttgggtg ctgacaaagt gccctataga 10800

gcggtgacac agcttatact tccagcaaca ttgtgttaaa agaacaaatt ctttcttaag 10860

cctttatcaa cactacattg gtaaactggg aaatagttta gcaagtagtt atacittaca 10920

tttgtaaaaa tttctatagg cttaggttgc taagatgttt tgttctaate attgcttttg 10980

cctactttga gttttgattt ttatggctgc aggatcactt gagcttataat catgggctag 11040

cttaagtttt tttttttttt taaacaaaat tattttatat gtatggttgt taggcctgtg 11100

cttgtctgtg cacaaccgca tgcacagagg ccagaagagg gcatgggagc ccttaaaaact 11160

ggagttacag acaattgtga gctcctgtgt ggttgctggg aatcaaactc cagtctttta 11220

aaagcagcca gtgctcataa ctgctgagcc atttcttcag cccaggtgat cagtttttta 11280

gcatgttttt cttgaatggg tattcgtatt ctgaccacag agtatacttt tctgtgcatt 11340

cattttttag ttagatttat catttcaaaa aatgattttt agccgggtgt ggtggcacat 11400

gcctttaatc ccggcacttg ggaggcagag gcaggcgaat ttctgagttc gaggccagcc 11460

tggtctacag aatgagttcc aggacagcca aggctataca gagaaactct gtctcgaaaa 11520

acaaacaaac aaaaaaaaa accaaaaacc aaaacaaaac aaattgtcat aaaagtcatt 11580

gaaagtcttt agaaaggcct tttctaattt ttttttactg ttagtacatt tatgatttta 11640

ttttaatctt tgtttgctgc ttagttctgg agtgtgaggt ttaatataat tttcatgatt 11700

taactccatt tattacatac tctgtctgac ctactgaaaa tggatataat ctcgttccgg 11760

cattgtttat atataagtac aaagttgttt taattactaa aggttttaaa taaaatactt 11820

catgataggt ttttttaaaa atcagaatat ttattttttc atcagaatat ttatgtgtgt 11880

ttaatatttt tttttactga ttttaaaaat ttattaatct ggatgcttct gttagaaatt 11940

agtcaggttt attttatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatttaaa 12000

tttatttttt gagacagggt ctctgtcctg gacctggctg gccttgaact ctacagagatc 12060

tggctgcctc tgcttcccaa atgctgggac caaaggcctg tgtcaccatg tctagctcaa 12120

ttttaagtc ttaatttacc ttttcctttt acaggtaata tttatttagt gtgtgctaaa 12180

gcatctttgt ctactccaga attgctgttt tcatcttgat gtttaatagt attagttgct 12240

atgtttgtat taagctctat tttgaagtaa attttgctta tgggatatgg ggtgagttag 12300

ctggcaagga gacaagatgt ctacccaaaa cagaaaagac ttactatagc tactgacagt 12360

agtttcaata tcagcatttt ctgcagctat ggtggatttt attacagggg aggacttttg 12420

agctgagtga aaatgacttt ttaaaaagat ttatttatit tatgtatatg agcacactgt 12480

agctgtacag atgggtgtga gccatcatgt ggttgctggg agttgaaacc tctgctcact 12540

ccagcccca ctcactctgc ccaaaggttt attattatat gtaagtgcac tgtagctgtc 12600

ttcagacaca ccggaagagg gcatcagatc tcattatgga tgggtgtgag ctacatgtg 12660

gttgatggga tttgaactca gtaccttcgg aagagcatct ctccagccct gaaaatgaat 12720

ttttataact gtaaagcatg tatgatcttt gttgaggaag aactgatgc tgttttctaa 12780

gtcatattca ccacaggata acctttgaaa aggtacaagc aaggacagtc agtgtccagg 12840

ctttccactc ttacaatgta taaaatccca aaaagcccat agagaactat ttcttgaccc 12900

tgaattaatg aacatgtccc ttgatacagg atagagattt tgtgtatctc ttgttagatt 12960

tgtgcctaag cattttattg ttgttacaaa tgatactttt ttccaagcca ggtgtagtgg 13020

tgcatacctt tgatcctagc actcaggagg cagaggctgg cagatctgag ttcaaggcca 13080

gcctcagcta tatactaagt ttcaggtagg ccaggactac atagcaagtg tttttcccca 13140

tatttgttcc tattatatgg aagtcagtt tgagttttgt gtattatctt tgtatctgtc 13200

ttacactctt gataagttca ctttctttct agaaatgtat atccattctg ggtcctagtg 13260



atacatatat tttgagtatt tttgtgttaa atcttccagc gttgccaaac cttcacagta 13320

ttcatttaac tgatagattt gcctagtttt tttgcatgtg caatgtagtt tcccttgcct 13380

tattagatac aattttttaa attcatcaat tatatttttg gtaggtaaat ctttaaaatg 13440

aatgtgttaa agaagacagt atttgagttg tggacattgg tgagattgta gtaaaaaatt 13500

gcagtaatta aaaactaaca ttttagtttt actttgtaaa gtaatggact ttaagtcatg 13560

tgatgttttt ctgaacagt caattctgtc catttcactg ggggtaaagg aaaacaagca 13620

ctgaatatag ggataaagta agttaaaagt ctggctatgt gacttcgagg ttcatagat 13680

gcgatattca gacacactgg gaagaattaa gtttggccag cacagaagat actggaagaa 13740

ctgggatgca ttgggaccat ttacagagg accttatttt agccaagggt tgattaaaaa 13800

atgaacaact gggaggagct tttaaagtgt tttgaccacg agaagggatg gacagctttt 13860

tctctctcct ctctctcct ctctctcct ctctctcct ctcttcccct cccctcccca 13920

ccactcccct cctcctctc ctctcttctt ctccccctt ctcccttttt ctctcttttt 13980

ctcccttttt ccctgtctcc ctttcttctt taagtaatat tagtgtaatg gcagtagagt 14040

ggaaggactt accagaaaag ttgtggcttc ctctttagca tattttaaaa taacattttc 14100

atatatagtt gtctttatgt atatttggat atactatgat atgttatctg ctcacagtag 14160

cacaaatgaa attaatgatt taaaatgtaa ggTTTTtaac TTTTTgaga tcagagcttg 14220

ctccggttct tctgagtgcT ggcattgcag acatacacac cattggTtag cttttgtctc 14280

attctgtaaa gtttggtgTt cttaatagTt ctcagaaaag aagccatttt ccccttttat 14340

aagcttaatc agtgTtatg tcaacttcct cagaaatgca gagtgTtaca tctttttatt 14400

taaaatagcc ccctaattat agtcattcat ttgcaaaagt gagggTcttt acaaaaaaat 14460

tactaagcta acatcaacag ctgtttttca aaacaagcga tacttttagg catttttaga 14520

ctaaaatttg tttccccttc tgcaccagTt tgagatagat gctaatatgt Tgttttatga 14580

atgaggggct gaggaggaaa gctagaaaat cccccccag ggccacacat gggcatagaa 14640

gacccgagat ttgaattcat atgtacctgt tgcccacat tgcttaaaga cccaaaaggc 14700

ctcccctcct gcgaagcatg tttaaaatga caaaacttat tttgtgatga atgaatttca 14760

agtttagata atgaggattt tatTTTcttt aaattaatga tttgaaatac taacttaaTt 14820

gccttagttg gctaaatgcc aagTTTTtct atgggaaata ttctggtatt agTtaaaaaT 14880

aagatatgtt tttAagaggt tcttgaaaaa gactggcaca attttaagTt agTtcatttt 14940

gtggctagtc ttaacaatag cttttcaatc agtgacttct aactatatTg tgtagaggta 15000

ctattttgtt aaaaaataa aaaaactttc tttttaaat gcttcatcta gttgaatatg 15060

ttggttctgc cttttgagcc caaatgtgct ttttctttt ctttctttt ttttttttt 15120

tccttttttg attcttcagc tgagagcaag aggatttatt gtacacaaga tacacttgac 15180

cacaagtgag atcagaacta gtccagaatg ccaaaggcag agggccagcg ggactgtttt 15240

ggttgatgaga aaggcagtca gtttcctcgg tgatctgggc aaggtgacat tccaggtcca 15300

ctgagactta ttaccgacag cagcctgcag tctaacaact gtacctggct ttgagcatct 15360

tttctgttcc tgtaggcatt gtgggtacac aagctagttt acttgacat ctgcctcatc 15420

ttctcttgag ctgtgtttga gcctgagtat tctcctctc tgccactttg ctctcatggc 15480

acaagagtgt cgaggaagat ggtgctaagg ccaagcactc tttttttaac aacaaacaaa 15540

caaacaaca aacagcccta aaacctaata tcaactgtgat ggttatcttt gttaacttca 15600

caccacctat attcaccctg gaagagagct ttagtgcaga gctgtctata tatattaagt 15660

tggtctgtgt gtgtctgtcc aggattgtct tagttaattg atgtggaagg acctaattcca 15720

gtgtaggttg taccattccc tatgtagagg tccctgcaat ttctaggagt agagaaatgg 15780

aattgagtcc aagcaagcat gcacataatt tctcttttgc tcttgactgg ttatgatgtg 15840

actagctggt cctgctgtga tttctctaca attatggact ggaattgtaa gttaaataa 15900

tcctttctcc cccaagttgc tttcagtgag gatgttttac tatatcagca gaaatgaaac 15960

taggagagtc acacataaca ttttaagaaat atgtacatgt tgtacatacc gcagaaaatt 16020

tcctaagtaa ctgttggcct tctggtttgg gtgatgttct ttcctaccta tttcttggtt 16080

tactgttttt gggtgtgact atgcttgtgg tttgtgacca gtgtctaacc aaactgttga 16140

acctggctct gaacatggga attcacgtga ttctcccttt tctttctttc ttgtttgttt 16200

ttgttttgt ttttttcaag acagggtttc tctgtgtagc cctggctgtc ctggaactca 16260

ctttgtagac caggctggcc tcgaactcag aaatccactt gcctctgcct cccagtgct 16320

gggattaaag gcgtgtgcca ccaactgccc gctgattctc ccttttccag tctcatgagt 16380

aggttgggat tgtaggcatg cactgccatg cctgggttat ggagaccttt ttaaacattt 16440

cagctttttt tttttttctc accatctatc tcactaagg atgctgtgac attgtgcctt 16500

gtggggattt agtcacaatt tathtagcat tatgaaatta cctatcccct gttgattaag 16560

gggacttgga agagaagtcc attttttttt tttttttttt ttgtttaact atatatatct 16620

tttactctgt gttaatcagc attgtttagc ttgtatttag cttgtattta cttggtagaa 16680

gtgtctttcc aagtttattg ggtcatcttt cctgttatgc tttgaattat tccaagtagt 16740

cctgtgctgg agtctttccc tactatatat aaaacagaag attttttagt tttctgaacg 16800

ggtacaaaag atattatata caacgttaac cctgtaatga atactgtatt gtctacttga 16860

gttgacagta caaaatataa gatgggtagc taaaacaaca gacgtttctc acaatgctaa 16920

agattgagaa gattcattag ctgtgcagca aggtcgattt tattgtgaga caacctcttg 16980

gtagcttgct ttctgtgcat attctctggg atctcctctt gcgagggcag taatcacatt 17040

gagtcagagc ctcattttca ggacctcatc taactctggg cacctcccct aagctatatc 17100

tggacatcta atgtaggaag ttaaaaattt aacctgggaa tgtggccagg gcacaaacat 17160

tgctgtatth tatgtaggaa agattggagc ttaattatag gagtgcctcc cgttagttht 17220

gaaattagth tttgtthtth ttggattgth tttattthtt atataaaggg gaactattac 17280

caccattatg acaatagggt ggtatgtaaa gtaaattgta ggggtataaaa tacttaaaac 17340

aatgagaag gcaaccaatg ataataagag tagggctgct tttattthtt agtggcattt 17400

ggacagtggc acatgactta tcttcagtac tgttcagtac tgccatgcac tgtaagagaa 17460

gaatataaaa gaaagtatgt aattctcaga aagtgcctth ttaaatggaa catatgctag 17520

gaacaaatga ttacttgaaa tagttattaa tttatcatat ttaatctthtt atgattaaag 17580

atggagtagg acaaggtttg gatacagtat attaagtgat aatactgtgt ggaaaatcac 17640

tttgggtcaaa actcaatata aacatgctgt attgcctctc aaacaatgac taacatttag 17700

tcatattagt tactatttcc tacttccttt ctgccttact agccatttct cttaaaatgt 17760

ggtagctca ttgtgaactt ccccttgctt agtccttgc ttctactcct ccagcctgct 17820

tgtatttctg ctgaggttgt attctgtttg tttttcagat gagacccttt ttgctcttcc 17880

tgctgcatct gagcctgtga taccctctc tgcaggcaag ttctttctgc cagcctttct 17940

tctgtattct aactcactct aatgttaact caacagagta ctttgcatth actagaaatc 18000

aatgttggtc caagaatgtt gtttttacia gagagacatg gtcaggattt gattcataat 18060

tgtaattcat aaggaattct tggactcttg gtttatattt acataatcat tcattttctt 18120

caaatagttt gcctttgtat agccacaggc ctttatgtaa tggaataact gtctcattgc 18180

ctttgataat ccagtaccct gtctggcctg tgcagctggg tactcactca tcaaacttta 18240

ctttctcttt aaactattta gaaatagctt tttctagtta gtaacacctg aagttttctc 18300

agatttgatt tatatctcgc atagtaggta actgcctctg aaactgcaca ttattctttt 18360

ttcttttaggt actttaataa ctgtatttat aggggtacagt gtgatgatcc catacattat 18420

tcattgttgc ctggtcaggg ttagccgatt agcatatcca tcattcttaga tgtttttaaat 18480

tactttgtag tgatttagag tcttcacttg gctataaaca ttgttaactg ttgtacagta 18540

gccatgtact ctttaaaatt gacaatagtt catattttca gtaatgatcc aagtctgtat 18600

ttattaacta aatgctattc atattcattt aataataaat gtttactaac acttttatta 18660

atatgtcata atacttgcat tagctctgag aacattggca ttctctaatt ttcctttcta 18720

tccatggcca cagaaaaaat tatggatttg aaggagcagc caggtaacac tgtttcgtct 18780

ggtaagagg atttcccatc tgtcctgttt gaaactgctg cctctcttcc ttctctatct 18840

cctctctcaa ctgtttcttt taaagaacac ggataccttg gtaacttacc agcagtggca 18900

tccacagaag gaactattga agaaacttta aatgaagctt ctagagaatt gccagagagg 18960

gcaacaaatc catttgtaaa tagagagtca gcagagtttt cagtattaga atactcagaa 19020

atgggatcat ctttcaatgg ctccccaaaa ggagagtcag ccatgttagt agaaaacact 19080

aaggaagaag taattgtgag gagtaaagac aaagaggatt tagttttagt tgcagccctt 19140

cataatccac aagagtcacc tgcgaccctt actaaagtgg ttaaagaaga cggagttatg 19200

tctccagaaa agacaatgga catttttaat gaaatgaaaa tgtcagtggg agcacctgtg 19260

agggaagagt atgcagattt taagccattt gaacaagcat gggaagtga agatacttat 19320

gaggggaagta gggatgtgct ggctgctaga gctaatatgg aaagtaaagt ggacaaaaaa 19380

tgctttgaag atagcctgga gcaaaaaggt catgggaagg atagtgaag cagaaatgag 19440

aatgcttctt tccccaggac cccagaactt gtgaaggacg gctccagagc gtacatcacc 19500

tgtgattcct ttagctcagc aaccgagagt actgcagcaa acattttccc tgtgctagaa 19560

gatcacactt cagaaaacaa aacagatgaa aaaaaaatag aagaaaggaa ggcccaaatt 19620

ataacagaga agactagccc caaaacgtca aatcctttcc ttgtagcaat acatgattct 19680

gaggcagatt atgtcacaac agataattta tcaaaggatga ctgaggcagt agtggcaacc 19740

atgcctgaag gtctaacgcc agatttagtt caggaagcat gtgaaagtga actgaacgaa 19800

gccacaggta caaagattgc ttatgaaaca aaagtggact tgggtccagac atcagaagct 19860

atacaagagt caatttacct cacagcacag ctttgcccat catttgagga agctgaagca 19920

actccgtcac cagttttgcc tgatatgtt atggaagcgc cattaaattc tctccttcca 19980

agcactggtg cttctgtagc gcagcccagt gcatccccac tagaagtacc gtctccagtt 20040

agttatgacg gtataaagct tgagcctgaa aatccccac catatgaaga agccatgagt 20100

gtagcactaa aaacatcgga ctcaaaggaa gaaattaaag agcctgaaag ttttaatgca 20160



gctgctcagg aagcagaagc tccttatata tccattgcat gtgatttaat taaagaaaca 20220  
aagctctcca ctgagccaag tccagagtgc tctaattatt cagaaatagc aaaatttgag 20280  
aagtcggtgc ctgatcactg tgagctcgtg gatgattcct caccgaatc tgaaccagtt 20340  
gacttattta gtgatgattc aattcctgaa gtcccacaaa cacaagagga ggctgtgatg 20400  
ctaatgaagg agagtctcac tgaagtgtct gagacagtaa cacaacacaa acataaggag 20460  
agacttagtg cttcacctca ggaggtagga aagccatatt tagagtcttt tcagcccaat 20520  
ttacatatta caaagatgc tgcattctaat gaaattccaa cattgaccaa aaaggagaca 20580  
atttctttgc aaatggaaga gtttaatact gcaatttatt ccaatgatga cttactttct 20640  
tctaaggaag acaaaatgaa agaaagtgaac acattttccg attcatctcc cattgagata 20700  
atagatgagt ttccacatt tgctcagtgc aaagatgatt ctccaaagga gtacactgac 20760  
ctagaagtat ccaacaaaag tgaaattgct aatgtccaga gcggggccaa ttcgttgctt 20820  
tgctcagaat tgccctgtga cttttctttc aagaatacat atcctaaaga tgaagcacat 20880  
gtctcagatg aattctccaa aagtaggtcc agtgtatcta aggtgccctt attgcttcca 20940  
aatgtttctg ctttggaatc tcaaatagaa atgggcaaca tagttaaacc caaagtactt 21000  
acgaaagaag cagaggaaaa acttccttct gatacagaga aagaggacag atccctgaca 21060

gctgtattgt cagcagagct gaataaaact tcaggtaata atccatgcac cgtctcacca 21120

acttcttggg ttactatgga atacagataa cgttttgtga cataacattt ataatgtatc 21180

atgtctactg tgtcatgttg atgagaatct tttttactag ttcagtttta gttctgtggg 21240

gctggaaaga tggctcagta gctaagagca cttgctgac tttaccctc tacaagactt 21300

aattaagttc gcttcccat caccgatgtg gtctctcaca atcggtata cctccagccc 21360

taagggatct gatgccctct ttgacctcta tgggcaacag acacatctga tccacatgca 21420

cacacacgtg caggtgaaac actcatacac aaaaaatcta aaatagagaa tgattaagaa 21480

aaaaagtttg ttctatccag gtagtacagt atagtctcaa ctgcaatcag gagttcaaag 21540

taaaaggatt cttgtgaatt tgttgcaaaa accaagaata caaaagtttt atgttatttc 21600

ttcccacctc acttctactt aacactcatc ttactgtag gcttttccat agttttgcat 21660

caatgaaacc aggaaaaaat tagtaaaatt atctttcatg atgcattctt ttcttcagtg 21720

tttctgctg ctgtgacaag caagggatat taaaacaata ttttcatata tgtttatttt 21780

tatcttagat atgatttcat gacaaacttg caaaagatga ccatttctgt tgcttgcttt 21840

tggtatttac ataaaataca ttatTTTTtct agtgagaggt atgaggctag aaatactaag 21900

tatagatttt tttaaagaaa gtaattactg aaacatgcta tcaatttatg aaaagctctg 21960

tttatgtatt ttttaagtgtg ggagtgtctt gtctgcatgt atacctacat gccagaagag 22020

ggcatcagat cccTTTtatag atggccttaa gccacatgt ggttgctgag aattgaactt 22080

aggTcctctg gaagagcctc cagtggccag tgttcttaac cactgagcca tctcaccagc 22140

cctcatttat actTTtgact caacatttgc tatgcttggt ttgaatgctt ttttttaaac 22200

ttggcattct gttagctgtg ttttctagta gcagttatgt tgtatttact tacatattag 22260

agacagctag catcagatga gtatagaaat taattctggt acaagaggag agtctgaata 22320

ttcagataat gaatccggca tcatcctcct gttgggagga tatggagaga agtaccaaga 22380

ttctgggtgc ctgtcatgtg tgcaagttag caacatgaga acaaaggtg ggggcacatg 22440

agaaaataaa atgggttttg gagaagatta atttaatttg aatatattag tattgagact 22500

attaattgag tattgagaat tattaatgcc atatctaaga aactttgaaa caacttgtct 22560

ggctattaca tgcataattt gccatgaact tggagctaaa aattaaagcc acagatagga 22620

acaagggaaa atcagaatgc aaagataaat gggcaacacg ttaagagcta aggattgaaa 22680

aaggagggaa gtaagtacgt gcaaccaaga cgcagacaga ctcaattttg ataacagaac 22740

aagaacaaga aggaaaaatg ttagccagca gaggaatgga atatggaatc gaagaggaga 22800

ttctcctccc cactcacttt aggagaatca gttaataggt gctaatagtt aatagttaaa 22860

atgtacatag atgccagggt aaactctaga gttaaagtga aggggttggc tttgtagcgg 22920

aagaaagaat actgcatgta gtgggtagaa agaaatctgt ggatgcgtat tgatactgct 22980

agggaggatt ttgtgtctga aactgaggga cttggttgat tttaatgtta aagcagtgtg 23040

tgaggtatth gccgagaata agttgaaaca tatttggcaa agtaactgtg aaattattcc 23100

aactagagga agcaaggga gtgtgttaag agtttactca gggctttgtg acagcagtct 23160

aggcaagtgc attatthatt gagctatacc ctctgccag tgactttcaa tgtgctaaat 23220

agtctggata tgggacaga gaatgtaaca ggtcttattt gaggtagttc tgttttgta 23280

catgggccag tagaaggaca gtgagccaag agagttgaga ataataggaa tgaagtagtt 23340

tgaagtcatt gaaatgatgg gctggcatcc aggttgaagt gaataggaag ttgatagaaa 23400

gagagtagta gatgaagtga attgtaggtc cagattaggt ctaagaacca aaagtgttag 23460

gaagaaaaat gtgactctta gaatgttttg ggaaacatag taagatgtat gtgttgggta 23520

ttgagtttag aatthtactg caaaagcagc tccgagacca aggtttggcc attaagaaag 23580

ttgctgaggc caagaggtga ccgtattgca tatgctgctt agaataatga caggatttca 23640

ggtagacatt atggttaaggg acaagggaact ggggaagtgg ttcaggaata catcacttga 23700

taaaagtata tggccagagt tcagatcctc agtaccaccac cacataaaag cttgcagcta 23760

cagcatactg aaggcagaaa gtggacaggc ttgctagcta gactacctga gtcagtaagt 23820

tcagggttgg gcaaaaagat cctgtctcag taaacaacct gtggcatcta tatgatgtac 23880

ttaaattgagc acgcatgcac actccctcct cccaaggtgt aagaacaaac aaggacaaga 23940

gtcttttgta aaaggctttt gggtaactga tggggagaat agacaaaagc agtaagaaaa 24000

gatagagtgt gacctagcca ggcttctaga atgatggtct agatcgggaa gcagcattag 24060

atagcagcag agtacttgac ttgccttgtc tccagttgtg caaagtatgg gaaagtaagc 24120

agccttgatt ttagaagcac cacagggaaa gcagtgtcaa agaagagttg gttgttttgt 24180

tttttttttt tttttttttt tggtttttcg agacagggtt tctctttata gctctggctg 24240

tcctggaact cactttgtag accaggctgg cctcgaactc agaaatccac cagaaatcca 24300

cctgcctctg cctcccagat gctgggatta aaggcgtgcg ccaccacgcc cggcgagagt 24360

gaggttttaa tgaatgggaa gtgaaagaag gaatgcttta taaaaaatga aggattagaa 24420

gagatggctc aggatcaata ggtttcaagc agcatgttaa cgtgccctag gggaaactgt 24480

aaacatgcat gataacacgg tgcggtaagg ctagggagaa gcaggcatat gggcagtatt 24540

gaaatacctg tgaaatcgcc ttctaacttc atgctacctc ccaaaactca actctagtca 24600

tatgttctta gtttgatttt ggtaaaccta ggatctatag cccctagttt ggaatgaaaa 24660

ggattaaaga gcagcagtgc cttagaaggc taaataaaaa tgctgaggaa tgggttggtg 24720

ctgattttta aggaacaat atcttcaaga aaatcattta gctcaacctt ttcctccctt 24780

gtatgtatgt agagatagag acagcatatg tgttgcccc tgaggttgat gttgggaatc 24840

atctgcaacc actttctacc ttacattgaa gcaggctctca catatggcta gccagtctgt 24900

tctagggacc ctatctctgc ttcccatatg ctgggattac aggtgggtca ctgtgcccatt 24960

ctggcttttt gtggttctaa gatggcagac tgatgcttgt ttgtgtggaa ggtgtttaac 25020

ttctgagcca tatttatata tttagggtac tgttgataa tttgataact ttccagtgat 25080

caagttagca ttcccatgtc gttttttttt tttgtttgtt tttgtttttt gtttttttta 25140

agacagtttc tctgtgtagc tctggctgtc ctggaacttg ctctgtagat caagctatcc 25200

tcaaattttc agaaatccac ctccctcaga ctcagtgtg ctgggttgca ccaccactgc 25260

ccagcttgtc agtaattttt aaacttagca ttagctgcta tgtccattct cactagagga 25320

atagaacata atttgcattt aacaaatgtg tgtaagcctt taatcctagc acttggaagt 25380

cagaggcagg cagattctct gagtttgagg ctagactggg ctattgtaag ttccaggaca 25440

gccaaaggcta cacagagaaa ccctgtcttg gagaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaacaccac 25500

caaaacaaca taacaagtgt gtatattcca taaaattcac aggaagtgtt tgtataattt 25560

ggatgacatg aattctagtc tttctcacat ctagatagat gttgacttcc tttactgtaa 25620

aaggaatgaa gttagattag atttttctgc ttgatatttt tcttaattac aataaacatc 25680

tattaaaagc aggtacttat aattgctttg gcttggttgt ttgaagtact atcctgtatt 25740

tcttttcttt gagagtgggg gagacaaaaa tctttgttct catgtaactt tggcatgcac 25800

acacacacac aacacatggt tttgttcaag tagcttacag gctgtggtcc aggtagtcca 25860

acaatggtta tctcttgaaa gaaaggccaa ggatctggtt ataaaactga aagtcttagc 25920

catctcaatc ttttgcagcg ttcaggtaat tccttcagag gtcttgagtc tatgttgga 25980

cctcacagaa gtacattcta ataccaccag gggtattagt gccttagtaa cgggatagat 26040

gaacttgcca gagagactga ggtaaggaa gcaaaaagca aaagcttttt atgcaggctg 26100

gcccagattt agggatgaatc tttttccacc ttcagataat ccaggtttta ggtgggtctt 26160

cccatctcaa atgatcaaat caagaaaatc ctccacaggt gtgcccaact acttgggttt 26220

cttcagattt attttatgtg tatgagtgtt tgcttgtatt gcttctatat atgcatcaca 26280

tgagttcctg gtgccaggga ggtcaggggtg tattgactct cctggagctg gagttaaaga 26340

tggttgtgag ctatcaagtt ggtagagggtt tttaactttc tttttggttt ttcgagacag 26400

ggctgtatag cctgtatagc cctggctgtc ctggaactca ctttgtagac caggctggcc 26460

tggaactcag agatccgcct gcctctgcct cccaattgct gggattatag gagagcgcca 26520

ccacgcccag cggtttttaa ctttctttgt taggtttatt ctaagggttt tagaatttga 26580

aacagtttct ctctgtgcag cgggggtgggg aacctggaac cctccctatg taaatcagat 26640

tggccatgag tttaattctt cccgcctcta taccctgagt gcaagattaa atgctcttca 26700

ccacattgtt tcttgttcag tgtgcccttt gatggtatgt agacagtcta ctgtatcttt 26760

aatgctaact ttgaatccta accattttgt agaagggtgt tatcagatta tcagccttct 26820

tgtggagtct cgagggctct tgatgtatag aattgtaaca cttgaaaata ggattttttt 26880

tcttaactac ttcctttctt atttaaagtc cttttattac cttcctgtgt gttactacca 26940

aagccaggat ttcaagcatt tattgggtcat ttgtgcttta gtttttatga attgcttgtt 27000

taacctttgt tcatttttcg attttgatgc tctatgatct tgtttttatg tgcaggggtgc 27060



aaagtcttct ctctctaaga tttttatgca cacatcagtg gacagtttga cttttacaaa 27120

ggaagccgct ttctttttac tactcttaat tttattctta cttagttcca atttatttat 27180

aattgtcgca gttattttta ttcccatcat attctgatct agcctcctgg tgccaggcaa 27240

ccattcaact gttggatgat tgagaatagc ttttgctagt ttcccagtgg ttggttaggc 27300

aatcaaatgc agatttgggt gttggtgccca tctagtgtgg gtaatggtaa aaccatttct 27360

atggaatatt tgataagtaa ccatactgaa taaatgtggc tggtcacaaa atttcacact 27420

tgttataaaa caaatttata aactattttg aattttgaca tttgtacag aattaaatac 27480

ttgagctatg ctataagcat tctgaaatga ccctgaagat gtgtttctgt taaggtaaaa 27540

ggcctaatga ctttaattttt aaattgtaag tttagaaata ctttgggtct ttaactcact 27600

cactctctct ctctctctct ctctctctca catgcttgtg cattcgaggt cattgcattc 27660

aaggtctcat atttgatgag gcatgtcagt ttgacttcac aaaggaaagc ctgtttcatt 27720

ttttagtact cttttatttt tacttttagt tctgatttat ttataattgt ctggattctt 27780

gcagagttat ttttattccc atcatattct gatttaacct cctgggtgcaa gagaaacatt 27840

ttcagtttct ctggatttta atattcatat attgaaattg ctatgtgatg ttgttaaaag 27900

agtttgaaaa tgctcaattt tttgtcattt tgaatgttat tttttagatt tcaaatccta 27960

ttccattttt gaatattgag ttcaccattg ttgaagtact gacttttagt ccatagaggg 28020

cattagatta cagcatatgg tagggtttat ggttgttaat gtctctcagc agtaaaacat 28080

ctagttttgt acctctgtgt gcttagaatt ctaaaattag tttcaagact gctgtgtaac 28140

tgctactggt tcatattaat aaaagattcg ggctctccat tattaataga cgtctaaatc 28200

gtagcttccc aaaacaatat acaagcaaag taaatggctg ctctcttctc ttttctcttt 28260

tccttccttt tccttttccct ttttttcttt tcaatcttta aaggcacagg gaaatttaaa 28320

aggaaggaag gaaggaagga aggaaggaag gaaggaagga aggaaaagga aagggaaga 28380

aggggaagaa gagaaagggg aagaaggaga ggaaggggaa gaagggaag ggaaaagcaa 28440

aacaaaccaa aaattttgct ggcattaaaa gtaaaagaag tggaaggagt ttgagagagc 28500

aggatgaggt gaacaccagg tgggcttact aactaggttg ttttgtttct tttttgaaac 28560

aaacataact atataatggt agctggcctt gaactcagag aatgctacct gactgctttc 28620

ccaatgctgg tttaaaggct tgtaccattc tgggctttca catctgcttt gagacagttc 28680

tcttgctgtt aaaatccttc caaatagata caaactttaa aaaaaaaaaa aatgctcccc 28740

aggcagtggg ggcgcattgcc tgattccagc acttgggagg cagaggtagg tggatttctg 28800

aattcgaggt cagcctggtt tacagagttg agttccagga caaccagggc tacacagaaa 28860

ccctgtcttg aaaaaacaaa acaaaacaac cccaaaactc acacatgcta ctttatcaga 28920

gatttttttt attagcaact tatttaatta tattttttct tagttaacca tgcattgtaa 28980

aaaaaaaaa gtgttttgac taaggtaaga gagacattga aagtaggtaa ttttagatca 29040

tcgtactctt tagaagtgag ttggagacct tgcaggctct tggttttatt ttttagcat 29100

tatatttaca agtttgatct gtgactcttc ctttggcatt ctgtaaggag aaaatagaat 29160

actacaccag atattcaaag catcacgttg ccagttggtt tgcattgtga ttatttgagg 29220

actattcttg agagaatttt attctttaaa ggttgggtatt taaattcatt tagatgaagt 29280

ttaatgagaa agtatgaccc ataaattgtg tactcataaa ttttgctcgt tgatttttca 29340

gagtaaaata tttttgcttg gctaacttaa aaactgcagt tttaaaacac tgagaaagaa 29400

gtgggtaaaa atgtcagctg gtacctatga gttagctagt tttctctata cttaccataa 29460

attgtaataa ctaaaactaa agaattgatt atcattctgc aaaaacttaa cttaggctt 29520

ttaatttgct ttcttaaata aaagcttaca gtatgaaaag tacatttaat attcatatga 29580

gtggattatt acacacacat tcttggcacc ttaaaattag cagacaagtg aagtattata 29640

aatatgtgag ttacatatat gctgaatatg tttaccttag agaatatgta acttgaaggt 29700

actattttact gtcttctggt gtttttgttc tagtggagct cagattagaa cccatgcctt 29760

gagcctgtta ggtatacact ttacgagtta actatactcc ccgtccttgt ctgtcagttt 29820

gaaagagttc atttaaaaaa tactgtcctg gaagtattct gtattctttg aacagttttg 29880

gatgctaaac cgttatgtga agaggtcaca caatttcac tttgatgtaa tatggtggtg 29940

acagtgttct cagaataatt atatcatata aggtctcagc aagtaaagtt agaaatactt 30000

cagaattctt ttaaaattgc ttttatttat aattgtgcaa gagggactta aaaatgagta 30060

attggcattc tgaacactta aggattttgc aaggttttgc aggcccat aagtgagcat 30120

atttcaggaa gatatcccca tttcagtgtg gttacagcca tgagatgcat gtacttttat 30180

gcattgattt tatatatatt acatcttcaa atgccatacg tatttaaata tatttttagct 30240

gattaaattg gcactgttca tttccttttc tgcttaggca aatttagcat caggtaaaaa 30300

tcagttgtag aacattagaa agacacactg gaatgactga aagtttaata aattctgaaa 30360

aaatgggaaa ttctggaacc atttattttt atggctatta aattgtgcca ttttcatggg 30420

gtaaatagata tagttattag tacatgaccg tttctctccc agccaaagat ttattgcaat 30480

ggtaggtagt tgagtattta ttaaaagatt gaattggaac aggtaacaat taatctagat 30540

ttggaggaat ctagattttt agaaatgtaa agggaaaaaa aacctgatca taccttccag 30600  
gatgcaaaat atgagttctc taagcctcag taaaccaga aaaaaaggca gttcacaacc 30660  
ttgaaattga agttattaac ccatttggat tagtccattt ctgtcttggt ggtaactgt 30720  
tgattttaga gtttcaagta aaactgaaac agcagcacia ttgaactgtc cctaataaag 30780  
aaaagtcaag tctgtgggtg cagacttagt tctgtgtgtt tcaggtatat ttagcggttg 30840  
gctctgtag agagtctttt cttttgtag ctgcctcctt ccctgcaaag gtagctccat 30900  
ttggcatgat cagcaagcaa atggctaaga caatgagcag atagaaggga aagcattaat 30960  
gtctgggtat tagcagccta gttacagatt gtactgcgtc agcttgctcc acaccccaaa 31020  
gacatcaggt gactccagtt gttcagccgg gactgcaggc ttaggttgag caaacgggta 31080  
tctcatgtct cagggagaat tttgcaattt acagcttttc tgtagtatg cataatttgt 31140  
aattgctgct ggagggcaga tcgtggcaag aaatggacga tcagaagaaa cggttgaagg 31200  
acaagggtat gtcttttaac cttttactcc tttttatgta accagtaaga tttctgtggg 31260  
taagctttgt agtttagata tactcgggat tgaaagcgga gcctgtgatc atgtaatgct 31320  
taagattaac ataaaacagc tgcttctggt gttttttaca gttgattgtg tgcaggaaag 31380  
atatcatatt ctttttcact ggtgtttggt ttagtaattt tagacgtgtc tggtgtttct 31440

tttctaactt tgcgcgttga aattggtatg ggattaacat ctcatttggt ggtcactttg 31500

gtgtgaggaa tgtataataa acattacatt cttctgtagt ctgtgatgac atttcatgat 31560

gactttaaat aaagctcagc tgggtgtgcct gagatctatc cctaggtttg taggtagcag 31620

aattgcattg tatctttgaa aatctaaagt gaacatttga agttcttact tgaatgcatt 31680

ttaattttta tgtaacttga aactattcag atgtatacag agttttaaat gtatcccca 31740

atttactaac ctttgcctt gtaataacca attaatgatc ttgatcccg tcctccccct 31800

tgaaaactca gatttttaaa aatctcagtg attcattgtg aagaatttaa gcctgcaaag 31860

tagtagtaaa atatcgacta ttgaatatct caatagcact ttattatgta gcttgacaac 31920

tgctatgtaa tgagagagag agagagagag agagagagag agagagagag accgagtaag 31980

caagagttag ttgtttatct gactgtctag aataagttgt cttaaaaatt gttagaactg 32040

tttttaagt gctgagataa acatttctgt agctgactag ctgcagtgac ctgcttttaa 32100

accaaaacca aaaccaatca gtaaaaaaaaa aatgtggggg aaaggtgatt ttaacattga 32160

attcatatgt attcaatata aaggggaaaa cagctgtgag cttaagaaa ggatttcatt 32220

aaaaagctta ataaaaaagg acttttcttt agcttatcca taaatattaa aaatgaagtg 32280

aaccaatgtg ctagcttttg gtaagtaaaa agataacttga gataataaag tgggtgagaa 32340

gccacagtag ggcccatcct gcaactttca agtctctgca tgaacgactt caattgtaga 32400

gtattaaaat gttaagctct tataagataa tgtagggata taaagacaga aattaagatg 32460

cagtagaatc tatcttttgt gatagtctta actattaaag acccttaaac aaattcagaa 32520

tcactcttga gtctctctgc cgatcctggc ttigtittgt tgtaaacttg gtccactgat 32580

acttttcttc ttgtttttaa cccttgtctg agtaaactcag accaacctat tttttcctta 32640

tctaggtgct gttacatctt agtgtttctt gtatcagctg ctaatgctaa agattatata 32700

gtgaggttta aatcagaaac cactgagatg cctgaggatg atggtttttc cttactgtga 32760

aaaagtgagg aacctaacct gaggtgtcta cacgggtaaa cttaaaatat atatacttac 32820

ttagacctgg tccccatac ctgcattctt gtgctctcag actcccttcc caaagctgtc 32880

agtagtaaca aatattctga ttcatgtctg gctttgtttt tgttttggtg aagttttaaa 32940

tgtgtttgct gtttggtgga tttttgtttt tgcttattag atatctagtc ctttaggcaa 33000

agaggtatta taattggtgt tgtiacagtc ttgctatttt ctgttcatta gcagaatatt 33060

ttgacaaatg aaatctaata tttcattatt gaggttatat ggaaaactta gattaagatg 33120

ggaagacttg cgagtctagg tcagttgggg ggaagaatga cgtaactgtc agcagcagag 33180

acaactacac aagtaacca gggcaacctg caagttcttt tttagacaac accacaggaa 33240

agaatcttag gaccaaaga agaggttaac aggaagaggt gcctgggaag aaaatacagc 33300

atactgtgct cacagttctc aaagaattgg aactagcagc aggcattgtgc attttggtgg 33360

ctctcaaggt acatctcaaa ggattgctca gaaacttttt ctatacatga ggtagagac 33420

tgtctgatat gatagttcct tggatgggct caaacctaata aagataaagt caggacttta 33480

ggattgcacc aggggttagg acatgccctt ttgtttgtaa gtgggctttt gatgagattc 33540

ctaaaaaatt acagatgtta agtatgttgg aattcttgat tcttagttgg taagaggcct 33600

caccagggga aggggtcctt ttccttccc aacccatag tctttccttc cttccaatc 33660

acacctgctt tagaagcact gagaagacac tgttaataca gtgactagaa tttcctgggt 33720

agagtagact gtataggata atgttgacag atagatttgt aggctcaaag atgatagaag 33780

gtagacggt ctaggtcagg tttcctgaag cttctctgtg gttcacaaga aagagtcctg 33840

tgatcctatc aaaacaagct ctacagggcc tggcaatctg gtgtcatcat ttataattg 33900

ggcagatttg gaaaacaatc tagggttcac acctagttc tagtatgttt tgattttgac 33960

taggtatgaa actgcctctt aagtttttat tctgttgtgt gatttatagg gttccagttt 34020



tgaggttctc tggggtttta tgacaagatg ctctgggccca ggttgatttg gtttagatgtt 34080

taaagtaggt agtaataata agtagtggtg gggttcagaag gccatctgtg gtgtagtaaa 34140

agccggagga gaacctagag gcctgagttt gggatgattt tagctatgcc tggacttaaa 34200

aaagaaaacc ttgaacatca tctgaaatgg ggatgaaaag gaagtaacag atatgagaaa 34260

aataagtga gaaataacttg atattcatca taggttgcag gactacatga attcgaagtc 34320

acgatgaaca actatctatg ctcagcatca gtagattttt ttttaaagcc aaattgagtt 34380

ctagacactt tgaatttgaa gtgatggaca tagcaagcaa tgataaagat taaaaaaca 34440

atgcaaagcg agggatatctt ttttaaaaaa tcgaagatag ggaaggaaag ccattagcac 34500

caagcctaca ttaatggagc accaggaaaa gttagctcta acagcagtag gaggagtagg 34560

agagtgtggt ctcaccacca ggacaggact ggaggtctga ggaggactgg ctgtcaagaa 34620

actgtttaga atgaagataa agtgattgca gacgctcaga ttttaggaga aagtcagca 34680

ttgccatgt ttgctagtgc cttttagat tgggaagctc agctggcctt tgtgagaact 34740

ttcagtaaca ttaaaattca gtttgattat gcttaatgac aaagtggctt tgtcatcata 34800

tctggtgcat tcttccttg tggactcttt agggcttcct actttgcctg gaagtcaact 34860

gccaatctta ggaagaaacc tgcttttaat tctatctaaa cttacctaaa actcagtgt 34920

acttggacct tcattgtgtt tttctagatt tttttttttg attgttgta agtagcagga 34980

ctgtgtgttg tagaaaatag agaatggctt tgggttttta ataatgaagt aaggaactag 35040

aagattatat tatacattgt attctgtaat ctggaacaat ttagtagata tttccacctt 35100

taaagtcact tacatcactt taatatgttg ctggttaaag tgagtaaaat taaattaaat 35160

tctgttctta ttcatggtta ttgttcagtt aatgaaaatt ggggttaata catgcttgca 35220

gcattgcttt tcagaaaaat tgctttgagc aacgagttat tgtttgtctg ggagccatgg 35280

ctaaaattaa ttctgatggg ttttaacttta ggaattttta tcagttttta gtaaattaca 35340

gaaacaggtt tgcatttttt tttcagaagt gaatgtatat atgttttcag tggttataga 35400

gaaatataat aaaaaaaaaat ctccaaggga tatggattga gaccagtggg ggaaatttat 35460

tctgatgctt tccttattta cccctatctg aatattcgta ttttttttaa tcaggactgc 35520

taactgatct atacttcatg tgatggctga attgaaatta tcttcttcaa gaacagttgt 35580

aattgtgcca ttgcaagagt ttttctttgt gtttcaagtt caacttatac tgatgaccc 35640

tggctaatta taaaggcatc ccatgactca gtcctagctt actcccatcc ccacacgacc 35700

ctgaagggcc tgctccatca acatgcctgc tattttatct ctctgatttt acctcttaca 35760

ccttttcttc caatttttat ttgaccatg cagtatttaa gacacattct tcccagatag 35820

acatgatact ggccttcttt aaactcttct tttagattgt gacttctatt ccattacata 35880

tgggctttat gtctgtaaca ttctttaaag gtaaaaatgg tcctttcttc ctgggcctcc 35940

tagttggcat gcataatttt tctataaaat gacagacata tttaatgggt tactccttgc 36000

cttgaacttt gtacatatat ttctttttta aaatgataca tccccccac cccattggg 36060

gatttaggat tctccttttt tcttaaagga gcaatgaaac aattaagact cgtaggagtt 36120

ctgaaagata gcttagcagt tataagcact ggcttctctt gtacaggacc caggtttgat 36180

tcccacatgg caactcaca ccatgtgtaa ctccagttcc aagttccagg gtctcctaca 36240

tcctcttctg cctccatag gtgccagggt tacacatggt acacaaacta aatgcaggca 36300

aaaatacaca tgtaaaagta aatacttctt aaaaagaatt ttagatttca cctgcagata 36360

atgagtcttg tcatttacat ttattgtaac catttagttt tatacataag gaaaccaaga 36420

aaactaaata tgctagggtta ttgcataga cttcaaagc tggagtatga gaccttgatt 36480

ttatagtttg tatgagaaca accaaggagt gatgaggaaa aggctgaaaa ttggcccatg 36540

ttgtgataat ttattcatgc atagcttact atggcagctt tttgtatgtg gtaccattta 36600

ccacttactt tttttatttt atgtatatga gtacactata gcagtcttca aacaccccag 36660

aagagggcat cagatcccat tacagatggt tgcgagccac catgtggttg ctgggacctc 36720

tggaagaaca gtcagtgcc ttaactgctg agtcattctt ccagcccctg gttctcactc 36780

ttaagaaaaa aagagcagta gtcttagtat caactgtgga aaaaggtaga tgtggttagt 36840

agtattactg aaacttctgc tgagcctgtg atataatttc tcttaaggac tggattccgt 36900

acttgctgta ggaagaacat ttcaacagtc aatagaattc tctttacttt ttcttttttt 36960

cttttctttt cttttttttt tttttaactt aatctcatct gttgctagaa tttgggctta 37020

agggtgttga gtttaattta gtttaattgt atgcagtcctt ttataactaa tttttataac 37080

taaaaattgt caaattttgt gcaaggagtg tttaggagta agtaagtaga tagatacata 37140

gagagaaaat acttagcttt aatttagaat ggtattacat gtatggactt tactatgaat 37200

ggaaaattat accatggttt agagaaattg gaaatgtgaa gttagggata ttttctattc 37260

tgtttttgta tattgatgcc cccaacatga aaattttttt atgtgtgtaa gtgtgtgggc 37320

tctccatgtt gcagtgtgtg tgtgaagatc ggaggatgac atctatgagt cctgtgggtc 37380

ccaggtatca gactctggtt attcaacttg ttgtcatgtg catcagtttg ccagcccgtt 37440

ttgtattgaa agctatatga actaaataat cagtggtttg aattattaat gagtcaaatg 37500

tggtggtagg agcttactat tcttattttt taaaaaagtt gtttttaaaa tagggcttta 37560  
aaattgaaac ctgacttcaa gctaacttca ggctaagttg aatgtaaatt taaggaaatt 37620  
catttaagga aaatgtaaca ggatgacttg tgcatgtaac acatttgatc tagcactatt 37680  
ttagctata gcagatgaca gcctgtgatt accaaatgta ggcagctctt ctttctttgt 37740  
accaagtcag tgaaagaaaa actgggttcc tttaaattta aattttagtt aggtaagggtg 37800  
cactatacaa aataatcaaa agttttctat attttttaat ttgaaaaca aagataaact 37860  
gcagggaat gaatctatit ttctaaatta tttaactaga ttggcataaa cccctatgtg 37920  
tttcccatag ttgtaaggga aaaatcactg ttcagttctt cttggatctt taaaaggggt 37980  
gttctatgaa cattttatat gagttagaaa cttccttata aaaacatgct ttatccaata 38040  
ttttcataag aatttcctgc atgtgagtgt gctgcctgcc tgggtatgtg tgtatcacac 38100  
gtctgcctgg tgcccatagt ggccagtaga ggagctagtc ccctgaactt catttacaca 38160  
ttgttgatgaa tcacagtggg gtgatagaaa tcaaacctgt gtgtttctaa aagagccttc 38220  
tctctagcac cccttatcag atatttactt tgtatttcct cccattttgt agattgtctt 38280  
caccttcttc attatgtcct ttgaaacaaa atattttatt ttaagaggct cagtatattt 38340  
acttttcttg tgtttatgct aataccatat gttaagaaac acagccttga agatctacac 38400

tttcttttatt cttttaacta aattgtttatt ttttaacagct acccttcatg taaacatgtg 38460

taggaatgtg tatagaggtc aaaagacagc ttataggac taattcttgc cttctaccat 38520

gtggggctag gagctaaaat gtcttagcaa gcttggtggc aggtgcactc agccattttg 38580

ccaactgtct aaaagcattt tatagtttaa actccaatct ttagattttt attctatttt 38640

gagttaaaac aatattttgt catctttaat agtgtgtttg tcatgaatgc agatagctac 38700

tgtggctaga gtggtcagat cctctggagc tgaagttaa gagatttggg aaccattaat 38760

ggctgagcca tctctctacc ccataagtta acccttcatg tcatataaag tacaggaatc 38820

taaggagtcc agtggcattc ccctgcagtt ggacatccag ttgttcttag cttccttgtc 38880

aaattcacct gactataaat ataaaagttg attgtatttc acttatgttc ctttgtaacc 38940

atgtatatga ctgtagggtc gggtttatgt tttgttttct ttttttgaga cagaagcttg 39000

ctatgtagct ccaactgact tctagcttgc cattctcttg ttactgaaag ctttgcagga 39060

aattttgcag aggagaaatg tgagcccttt aactttatta ttgttttcca ggatttcttt 39120

ggttattcca gatataattt ttttcagctg tcttgtcagt tcagttggag acacaagctg 39180

ggcttttgtt ttgatggggt ttgtacttgg gactaattag aggactgtta tatgtcatcc 39240

aagactgtgt gatatctttc tgcttgattc agccattaat ttcttttaac tgtaagtttt 39300

cggtttatatt catttgtttt cagctatgta tgttcctagg aattaaattt ttttgtttgt 39360

gaatgttaac tgttgttttg aaagtctgtg ttaagtcaga tgcagttggc tttgtatgat 39420

gttgtagcca caatgtcact agacttgttt aggaattcta gttgctgttt tgtggcttct 39480

ttaggaaatt ctaaataata gatcatatta gcaacaaata ccttaattta tttttgtcca 39540

atcaattcat tgcccaaatt ctgggtcaaaa acttctagga catatatggg tgtgaagtgt 39600

caaagagagg ttacccttgt cttattacta gggttaagtg ggaagatgct agtcttgcag 39660

catgttcact gtgattttgt agattttatt tttgatcagt ttgaggctaa ttcttttttt 39720

ttttcttgct gttttgttga ctgtttacca tgagatgatg ttggacctaa tcagtttttt 39780

atgcaactat tgtggcgagt gtgtcttatt cctattttgt ttttatggtg catgtgtggg 39840

ttgttattca tatgttgcac tacctttgca ttctcagaac agatcctcct aagctatgct 39900

gtaatctgtt tgcatcgcag gatcttgact tgtaaatggt gttatggtga aatcactgtt 39960

ctgtatttat acgggatggt tatctgtact taccctgatg tctttgtctg atttgggtat 40020

ctgaattgaa caatcttcta aattaactaa tgatataagg ctctgatgag ttatcagagg 40080

catgtagata tttctttgga tttttgtatc ctttttccc cccatggaga atcactgctc 40140

ttgggcgaat ttaatcttcc taatttaaaa aaaaagtaaa accaacataa agagtccata 40200

tgaaactaaa atacttttga caagtatgaa aacagacaac tgtttttgct agaaatttgt 40260

gtttttcttc ttgcagctt cactgacaaa ctctttacaa aatgggattg aaaatgtatt 40320

agtgcttgtc acagtgcttt ggacgatgga ttctgtcctg tgtgtactta cttaccactg 40380

tgtagctgtc tcacctcctg cctgtacttc cctaattggc tcaagagtat ctcaacttct 40440

gcattcctag gacttacttc agcttgacta atccatagtg tgtgctttga ggtagtcatg 40500

tgttttcatg tggatatctg gaactttcat gtatgacttc cagagttctt acaattattg 40560

acaagatctg actgcatctg atcatttatt aaattatcag gcagcattgt tctttgtgtg 40620

tatgagtgtg tatgtctctg cacatactgg tatgtggata tggaggctct aaggcagcct 40680

tgagtgggtg tacagagaca ggatctctta ttggcctgga gctggcatat gaggttggcct 40740

tttggccaat gagccctaga atctgcctct ctctgctttc ctgacatgag gattacaagt 40800

gttggccatt gtgctggcct ttatgtgttt gggggttggt aggtccctgt accaactgag 40860

ttgcttcccc agtccgtggg gttcttatag taggaaatcc tactctacca ctcatgaat 40920

ggggattaag gcagtatttt gtgattataa attgtggttg ccactagcat gagactgttt 40980



caagtagcac agaaatgtat aaagaaacag gtaagactta tctataatcc caatattaaa 41040

gaagtaaaaa tatttagtag atttttttca gacttaatgg ttagacatat tttgtttgt 41100

tttgtttgtt ttatatgtag cccaaaatgg tttcaaattc actgttgtag cccaggctgg 41160

ctttgttctc ttgattcttt taatactctg ttttcaagtg tcattatagg catctttatc 41220

tttctttaca gaccagtttt tccattatac gtatactagt tttaatcaaa ttcatactac 41280

ttttaaaagg tattttcaaa aacttgatgg gacagtgaga tagctcagtg ggtaaaggta 41340

cgtggcaccg agtctgacct cctgaattca atccctggaa cccacatggt atagaaaaga 41400

actgactccc acaagtatct cctgattgcc acacatgtac cgtgggtatgc gcatgctcac 41460

ttcattcaca agtacatgaa aagtgactgt ttaaaaacct aattatactt ttttggtctt 41520

gagaagtact tgttaaataa atgtattgct cttagctgcc ctgtcattgg tgtgtaaatz 41580

taggtatcta tgctggctag tatatgtcaa cttacacaa gctagagtca tgtgagagga 41640

gagaccctca attgaggaat tacttctttc tataagattg tctgcagagc attttctcac 41700

gtagtgattc atgggagagt gcccagatca tttgggtgat gctatccctg agcttctggc 41760

cctgggttct ataagaaagc aggctgagca agccatggcg agtatgccag taagtagcac 41820

ccactccatg gtttctatat cagcttctag tttcagtttc ctgccttatt tgaattcctg 41880

tcctgactta cttcaatgat ggtctataat gtgaaagtat aagtcaaata agccctttcc 41940

tccccaacat gcttttggtc atgggtgttc accttagcaa tagaaatcct aactaggaca 42000

atatacctata tcttgtaat ttcacataga cattcttctt ggtctttgtg gttcatttta 42060

catacaatga ctcttagtct atgttctgcc cattcatcaa acatgcagat gtacaacaat 42120

ctgaagaact tgaatatgct gacccttttag tttatgcaca ggggtgcttta acaatagcaa 42180

gtctcattat atatttatca ccttccactt cttaaactgta aaaagctttt tgtacagttt 42240

ttgggtgttct cataattaca gttatgtaca attgcttgaa aagtgatatg attaggtact 42300

tactgatttc atgaagtta tgtttggcac atagtaatgt ttctgagaag gttcagttta 42360

aaacacttaa gcctcttata ctcagaagta tacatcttaa aaggagatct attttaagtt 42420

tgcagcaagg cataggctaa tgccaatagt aaaagtttat tgattaggac ccactaataa 42480

taatttgagt gtaggacttt gtattaagta ttaatcatgt tagcctctga agggaaaata 42540

aattggaaga ctactttgt tgaagataaa acttaagtca agggagggtt aagtctcact 42600

ttaagttaca cagttgcaga gctagtagca ggaggtgggt ctctgaactt agcctcttct 42660

ttctactata ttcactagta tagaacctgt agattaatta aatcttgagt aatcaaaacc 42720

tttgaatttt ctctggtttt tacacatgga cacagacact tggaaagatc agttttaatg 42780

taacagtgtt ggatgctctt aatgaagcac ggtgagtgcg cgtgcattta tttgataatc 42840

ttaccagtag ggatactaca aatgaacaaa tggctttgag tgctttgaga ccactcatct 42900

ttatatgagt attttgctat aaattggaag aaaagtccgc tgattgttca gttctgggtt 42960

ggtgttatct taaaatgtat tattgtgtat atgtatttag gcatgattgt gtggagggtca 43020

gagggtcaat ttaacatttg ctttcttcca cttgagtctc aggggaatcat tagcaagtac 43080

tttttccatt tattttccct gtgtgggggtt ttgtttgttt gtttgttttt ttcgagacag 43140

ggtttctctg ttagacccta gctgtcctgg aactcactct gtagaccagg ctagcctcga 43200

actcagaaat ctgcctccca agtgttggga ttaaaggcat gtgccaccac tgcctggctt 43260

ctgtgtgggtt tttaaagtga catgtttctg tgtaacatca tagttcaggt caataacttt 43320

atataatgtt gaagttatcc cttttaagta cctagaaata aagggtgattt atttggggggg 43380

gggcaatatt agtaacacaa ctaataatcc tgagtcctat attaaatact ttaacttatc 43440

attttattga tagaaaaatc tcaattcatt ttctcattt aatgaatccc atctcagtga 43500

gacaattcct atttttatat atagttaaat gatgagtcta gaagcgtaga agggtttggc 43560

aacttgcctg aggttacatt gttagtaatt ttgtgcttct gttggagtct aggtcaccta 43620

gctctagagc ttigactctg ggcttatata acccactgtt agagcacaca agggaatctg 43680

acaggaatta tgctgccact gctgtctatg tcatgtcact cactaccctc actaccttcc 43740

ttgcattccc aacagggaaa gatgacatta ttagcttcgg gtagatgtga gtcctgccag 43800

tttccctgac tttttttttt ttttttaaat atgagtacac tgactcttct cttcagacta 43860

cactctcttc agacacacca gaagagggca tcagatccca gtaaagatgg ttgagccacc 43920

atgtggttgc tgggaattga actcgggacc tctggaagag caaccagttt cttactgct 43980

gaaccatctc tccaaacccc tggcttctta atggcagctg gattcctctg tttcagagtt 44040

tttaaatttc tttcagcgtc ttttacctcc cacccttgat ttcctagtagt agtgtaatat 44100

ttactttaaa actttactga gtgttctaaa tcaggtagtc cttgaaaaga tatacttttag 44160

cattttagaa ttgaaaagag ccttaaaagt acatttccca gctttctgct catttcacta 44220

ggctgacttt ctgtttttgt tttatgatct tgttatatat acctggctgg cctggcattt 44280

gctgctttta gtctggtttag cctaaaacgt gcaacactca tgctcagtct ctcaggtgct 44340

agaatgcat catacctagc tcaatgtgag aaaactattg atattgctgt gatctctttg 44400

ttgactgcga tgttatttac agtatcgttt tgacagcaca gattaggcta tttcaaggctc 44460

tggtcagtcc tcagatgcat tggtaggaac aagttgcaca catcagaact gatgtaggtg 44520

ttaatagatg gaggttaaga tcatagtgtg aaagcaatca gtgaaacagg ctgtgggtca 44580

tacatggaat ggatctggcc caggatatgc acatgctagg catatacact ccaagcccca 44640

cttactaagt gcttaatata tatactccaa aggtggaatt aaacctttgt aataatactt 44700

agtgttttat agcttacgta atttttctta caatgtactt tcagtgctaa atggaagcca 44760

tgctcattta ggatcctggg gatcaaaacc aatgcatccc tttgaagtgt gacttttaaa 44820

aatgttactc cctttatctt aaagttagca ggagtcttac ttgagtagtt ccctatttgt 44880

tttaccataa agtgtgtgga gtttttgttt tgttttgctg ctcttggttg gtcaccatct 44940

agagaggtga atactgtgta gtgtgtcaaa gagtccttcc ttcagtgcac tgttgaggat 45000

aatctcaaga gactacaagc ctgtgggttat ttgagccttg cagtagcttt gtttccagtg 45060

gccaaaagca gacatggtaa attgtctttg tctgactcta taccaaatgg tatggaatat 45120

tgtagtatgt aagattgggg gagtgtcttg tttgtttgac agcttttggt ttttgacccc 45180

tgcagttttt atgacttttt tcttctgttg aaggaaatta gttttttaga tgtctgaatg 45240

ctgttccccc tttatctttt attgtaggta acttcagtta gtactaggct aagatatcat 45300

tttaggattt tcaaaggaga gcttctaaaa gccaaagtgt aaatcttagg tgctcagctg 45360

ctaacatttc aatttttcac cttttttttc tatagatttt tattttattc tttttgtttt 45420

aattaaatca tttagttaca tatttttatgt atatgagtac aatgttactg tcttcaggca 45480

caccagaaga gggcattgga tctcattaca gatggttgcg agccaccatg tggttgctgg 45540

gacttgaact caggacctct gctcttaacc attgaacat ctctctagcc cttcaacttt 45600

ttaaaaaatt tgatttccta tacttatgtc ttacaatagt ctttttcgta tgtactattt 45660

ccctgtaatt tgaatatcat gcatagtatg aagaagaaat gtctcaagat aattttaagt 45720

gagctctgcc aggcctaaga agtatataag ggtaatttgt agctagaatg atttggtcac 45780

tcaggaggga ggttggccca aaagaaggaa aagtacaaac ttagcatttc actgataggt 45840

agcttatact gggtttaatg ttttagtgtg tttcctccgt gaagaacatg taaatgtgct 45900

aatccaaat ggttaagata gtattctaatt ttcagacttc ttcttttaatt ttttagttgt 45960

tgacctcctg tactggagag acattaagaa gactggagtg gtgttttggtg ccagcttatt 46020

cctgctgctg tctctgacag tggtcagcat tgtcagtgtg acggcctaca ttgccttggc 46080

cctgctctct gtgactatca gctttaggat atataagggt gtgatccaag ctatccagaa 46140

atcagatgaa ggccacccat tcaggtgaga tgtttgaaaa atgaggcaac agtgtaacta 46200

ggattggtag tgagacttca tctcctatct gtagaattat agttgtgtga tttctttgtt 46260

gcttagagat aatctatcaa gaacatatct gcctttgaga tttcttatgg tagaaaagac 46320

tgggctcatt agtatttata gtagatatgt gttatcacag tgaattttag aattggtgaa 46380

gttatattgt tcttactgtt tacatttaac actatctaact actatatacc ttttccttag 46440

tatatgttct tacctacatt tgcttcagtt tctcagggtt ttatacagag agaggagata 46500

acttcaaatt gaagcttcaa aatgacaatt atatgccatg aactattgac aaataggatt 46560

ttaaagcagt tgtaatgaaa tacatgaaaa tgttaciaag ttctaattta tccacagtat 46620

tagttttata tatcatttag ttttaaagaa tttttgaaga ctgccagttt cttttttttt 46680

tttttttaaa tatttctttt tagacatacc ttttccataa aggcatttac agtcttttac 46740

aaattcagct gacgtgccag tttaggcctg gtgaacagct tttcagttgc ctagtcatac 46800

tggtgcagtt gaaattatac agtggtgaaga gggaacagtg atgagcagca tgttaaaatt 46860

tgtcatacaa atgtctacca ggtggcactg atgcaggatg ctctcaaaga acaagccagg 46920

tttttttttt tttttatatt tctaggaatt gtatagacag ggctcagaag atggctttgt 46980

gggtaagact tgtggaaaca ggagggccag agtaccacat aaaactggtc actgctatat 47040

ggatgtctat aacccaaatg ttggaagtca gcaacaagta aatcctggga actcactggc 47100

cagctttgcc aaaaataatg gacttcacgt ggccccacat atacacatta aaaaaaatg 47160

cataagtaac ttcttgctgg ttgaaagtt gatgggaaac ttgggatggt ttaatttgat 47220

atttatgaat aacattggta taccagtatc tcctgctggt gtaaagaagt ggtctaaata 47280

gtctgccaac gtggggaact atgctgtctg cattcagagc tggatgtagc acttaataat 47340

gtggaagagg acataaatca caccgggctc tgcggactca gctctgacca gtcttcatgt 47400

gtgggtgggg tctgaggtga ggctagttca cgggataagt tgttatcaca ggaagaagtg 47460

accitcgctt taggaaagaa aatagtgtga cgaccaaggc attatggttt aaaaaatggt 47520

ttaaaatgat tcataactta tttctagctt taacataggg agcagtggga aggtgaccaa 47580

aattaggtat gctctctgat ggaatcagag taatacattg cttgaagtgg acatgattcg 47640

tcattctaac tatagagttg gaaacttgac tcagagaatt gaaatgcttt ttttgcaagc 47700

ttacttagct agaaaatagc caatcttcta atgcttacct gagcttaacc tactctgcta 47760

tttaggaag ctgagatagg ctaatctggt gttgatgcag agaaaacagg cttgcacact 47820

gatagagtat ctgagtgtgc aaataataac agatacttaa ctaacaagag tgagtgatca 47880

ggaggcacat ttgggccata ctgcaaaggt agtagtggag atagggttgt ctgagaggac 47940



actgtgctag gaaataatag gattagttag gtatggtgaa tgtcatcttt gaaataatca 48000  
aatgatcatc cccaaattgt tatcttggtta aatttaacac ttccacaca ctatagcata 48060  
caagagagca tgaaaataga gagtaaatat taccctttat ttattggtat tgccactgta 48120  
ctttaagcag ctattttaca tgctaataatt taacatttga catttttcca taaagtgaat 48180  
atggaaatga gtaggatctt tggtagcaga tcctaataag actcagaaaa taattttctg 48240  
agtgatctgg aggccaagtg tcattaaaca ttttactcat taaatcctca tgattaacgt 48300  
ccatttaaaa tgagaaaaca gttttagaag attaaatttg cacacttaga ttactaagaa 48360  
aatgatagca gttaaaattt aaaatgtctt taaaacacgc ttctatcagc ttggggggtt 48420  
tggttttggtt ttattttggtt tgagatatatt ctgtagccaa agttgggtttt acactagtaa 48480  
caatccttct gacttagcct ctcaagtgtt gggattacac gcatgaacca ccacagccag 48540  
cttactttgg atttttataa taagtgtagg cttttatagt agattgttct acactgttaa 48600  
tctcttttat agatctgtga ttgctgattg acatgtgaga atcagtgta gttgaggatt 48660  
ttttcttttt ttcttttttt aaagggcata tttggaatct gaagttgccca tatcagagga 48720  
attggttcag aaatatagta attctgtctt tggtcatgtg aacagcacia taaaagaatt 48780

gaggcgtctc ttcttagttg atgatttagt tgattccctg aaggtaagtt tattttgctt 48840

ttcatttaca tgtatcagac agattggcaa tataaaattc tattttctct atccaaataa 48900

atcataaaga tgaaatgaaa tcatatcaat gtaaatttag gtttgaaaac tcagtgtcct 48960

gtgttttagat ttgtgtgaga actatagttt gacacttttc tccttcaggg aatactttaa 49020

gaaagagaaa ttgagaagaa aattttgctt ttgattgtgg gtttaaaact caaaactcaa 49080

gaaaagtggg ttgattctgt cttcggatgt aagttcatgc ttcacatgt cagcatatga 49140

agtgaacca aataggtctc atagtgtact tcggcaaaaa agtatccaag gagctaaaga 49200

gatctgcaac cctataggtg gaacaacatt atgaactaag cagtaccccg gagctcttga 49260

ctctagctgc atatgtatca aaagatggcc tagtcggcca tcactggaaa gagaggccca 49320

ctggacaggc aaactatatg ccccgagtaca ggggaacgcc agggccaaaa aatgggagtg 49380

ggtgggtagg ggagtggggg ggagggtgtg ggggactttt gggatagcat tggaaatgta 49440

aacgaggaaa atacctaata aaaaaaaaaa gagtaaggca gaatgttttc ctttagaggc 49500

gacaggtaat aaacacttca tcatttaggt gacactctac agggaagggt cticctgggt 49560

gaatggggct ccactacatg agactgcttt cagcatgtat atgggtatca cagattccag 49620

ttgtttatga gtccaggata ttgtcttaa aattcaccaa aaatgtaagc agtcctcaag 49680

tggttggtggg cgaggcatga tgacacatgc ctttaatttc accactcaga gagcaaagtc 49740

agggggggctc tctgagaggt caaggtagg tcaaagtcctt ggtatcaaata aaaataaata 49800

aaaatagatt gtagcactca agagtctgag tgaagtttta caggtagtat tgcctttcta 49860

aagagagttc ctgcatgtta actttatatg tgtggttgtg tttatctatc atagtttttg 49920

tttctatgga aaagcaatgg tgttccttct gggaatggac tcctaatttg aatttttttt 49980

aaaggtgcta tgagcttttg actggaattg ctttgatttc tagttaataa aatggaaaca 50040

ttttaatttc tagaaaacaa attgacataa tagacaaact ctgtagcttt gacaacagtt 50100

tttaaagaaa catttgcaag cagtttatct catacattat cagctctctt aggtgtcctc 50160

agtttataga atggtagatt ctaggtccca gtatcactta catttgaaac ctctgtaaata 50220

atttgagtca ctcttgcaaa cacaatgcag caaccctcc cctgttccta ctccctttta 50280

acttcctttc ttctttccct ccagaatgag ggaagagttt ctttgcgttg tcatcaaaga 50340

aataacagat tccagggtc tgccttcagt cagcacctga gatgaactga ccacatgaat 50400

gtacctgggt tatttctgggt agttgacttg ggcaaatgaa aataggatat attgtcaca 50460

gttctgtact aacttcctgt ctgcttgctt ctttggttt gctcctctga aataaaattt 50520

aagattttta atcctagaca agatttcaag tatcatctat aaagtaatca attatccatt 50580

ttcctatittt atgggccaag tcagtcacct ttgaaataat tcttgatcca ttgagaaagt 50640

agcttagaca ttaaatactg tctacgtttt agggctatit attcagtttt aacacattgg 50700

gtcttaagat gggcgggtgg attataggca gaggaaagta gatctctgag ttagagtgct 50760

gcccagtcta gggtaagttc caggacagcc agagctgtac agagaaaccc tgtcttgaaa 50820

aactaaaagc aaaaacaaaa aacaaacaaa aaaccccagc aaaaccaaac aaaataccga 50880

gaaaacattg ggtcttccac tgctgcagca ttgccaggc tggctctgag caccacagat 50940

gggtagtaca agtatcacct ggtgctgtga tagggatgtt tcttatttgg ctaaggatta 51000

agtaagtatt tttgtgatta atctgtgtaa ggatctttgg tgaggactct tgttctaaaa 51060

agcagttttc attcatggct gcacattgga gtcaagtgag gaggtatatt ttatataaat 51120

ttatctggga aagtgaagga actggagttt ccattccctg aaggtctgat ttaatttatc 51180

tgagaacatt gaatgggtga tgactgtttt agaaagctat ggcataaccc tatttgtccc 51240

tacctccage ctgaccgtct gtccctcccc tccctcttcc ctccctccct cctccctcc 51300

ctccctccct cctcccttc ctaaatgtat atcataccta ttgggggtcat ctttggcacc 51360

cctagagaga agcttgaagc tttacggga aagctcctac cttgtaagcc aggaatgtgc 51420

acacaaatcc tctccctcgc ccccatgta tgtttgtgta tggagggaac gcattcttgg 51480

atacttagga ggctgaggct gggaaccact tgaagccaga ttaacactac catctccaaa 51540

aagtgggat cttgccggtt gaaacaccaa gtccaaaaat ttcatctaag aggactaag 51600

actgggcaat tttagtgagt tcttatgtat gcctgtagca aggcatggg tgctaaagac 51660

tagattttat atgatagtag atctctgact tttagtgaat aattgttcta gttgaagttg 51720

cctgatatgc aattatgttt taggatatga tttttcttt ttattggttc tttggtcaca 51780

tcataatccc cagttccact gatttccttg ccctctggcc ttgcaaattt ctttccaaaa 51840

taaaatttaa aataaaacaa agcatagaaa acatctcact gtgaaagcca tagcgtgccc 51900

cacagtatac cctttgttcc ttacatcttt acttgcaaat gtcatttca gtgagtcatt 51960

gcagctttgg atctgcagga ccagccctgt caagtgtcc atcaggtcat tgaggaggtc 52020

aattttggag tgggccaact cagagcccta gttctgggct tgagtgatgt ctgagctggt 52080

ctgttggccg ggtgagctct ctagcacctg caccaatagg gcaagctctt cagcattctc 52140

ccagctagct caccagtgt tgtaactggt gaggagcaga gccaaactctc ctgctctcgt 52200

gaccctgggg tcagctcttc tgactgctat aggttgtgag aaggtggagg gcatcactcc 52260

agtgcccaag gcacctcatg gcaggcaagt ggtggggcta gctcttcagc actcatgccc 52320  
tcaggtaggc tcacccacag ccagggccag ctctactgta ccttacctaa gtgaggtaca 52380  
gagcctcagg atataatctt aagtctgggc agagggtcct gcactctaaa aatagctgat 52440  
gcaaaagaac attcaaaggc tcttatgctg ctgtgttaac atgtacattt cagtatgtat 52500  
gttttctgac atgtttcggt gacttagaaa aaaattgaag gaaaatgtag aaacagtcaa 52560  
gggaatacta gaaaatgggt taatgtttct agaaaaggta aaataataat tttcattggt 52620  
ttcaagtttt taagtagcca aaattgtcaa agtatctgaa aatctattgt gtgccctct 52680  
attttcctta aatatgtgtc tttcaccaaa taaagctcta cagagttttt aataaggcgt 52740  
gtttaaactt tattccctta tactcgtgga gaaaaggcaa tgccctctcc ccatgtgtat 52800  
tgcatttcca tacacttggc ttgttgcagt cctagtactg tcaatagaga acatgacaga 52860  
caagcttggt ctcagacact ggccatagct gagaaatcct tttcagagat ctacaccag 52920  
gcataacctt gatttgtgac ttagatgaag aaaaaacttt cagggtgagg tgataggaag 52980  
tacaatttat taaaattaag gccaagtggc cagaaaggaa gtgctttctt ttctccatt 53040  
gttgaaagct agaccgtgac tagaagtaga agggcagtgt gtccttcctt cccatgctct 53100  
ctgttctgag ggaaggcagt tctgctctat catggcttct aaagaaagt aatcaactcc 53160

catttttgggt ccttaggttt ctgaagtaag acaataaata aagactgact ttactgggtt 53220

ttcaaggctct gtgcctgtta gactggcatt taaatgtata tgtttcagaa gaaagtttaa 53280

ttttgcttat catgggctct tgtttgatta cagtttgcag tgttgatgtg ggtatttact 53340

tacgttgggtg ccttgttcaa tggtttgaca ctactgattt taggtaagtc tacaaaaaga 53400

ttgacaagca cttagggaca tttttagaga atatctttat tgtaagaaaa aaaaataaaa 53460

atgtgagatt gggagatgtt taagtagctg atactgtttt attgaaatgc tatgttagct 53520

cctgaagact actccagcta acagctgcct taggtgcact cttgagctta aattggggaa 53580

gctgtatttt atagaatctc tgtgatgtga tttgaagcta agcatgggtc cttcagcaca 53640

tgcaggagaa tgtgagcatt tcccaggcct caggagaatg tcaacattta tgtaggcttt 53700

aagagtactg tctggttacc ttgattacta ttggcttgat agtatgatgt tgactcctag 53760

aatggtacca gtcttctttt tttttttttt tttttttaat ttatttttaa agctctgtgt 53820

ttactttttc agctctgata tcaactcttca gtattcctgt tatatatgaa cggcatacagg 53880

taatttctta actgtggaga ttgcagaata tagagctcac tcttattata aaggacttag 53940

agctagtctt tagtttggtg gtatgtagta ctgattgata ttctttggca atattaattt 54000

tataatgctt ttatcctctt ttctcaggcg cagatagatc attatctagg acttgcaaac 54060

aagagcgta aggatgccat ggccaagtga gtatgccctg cagccttctt accaagggcg 54120

agaccatcat ccggcagtgt ccttctgagg ccagcattaa ctctttttaa tgcttttttt 54180

taaaaaacat taggcaaagg tggaaaatta gtttgtatth tggtagctth atgattctct 54240

aaataatata cagcataacg ttttttaag aagtgggaaa caaacacaaa atttgacatt 54300

tttctttttt catttgtaga atccaagcaa aaatccctgg attgaagcgc aaagcagaat 54360

gaaaaggccc caaacagtag acattcatct ttaaagggga cactcccttg gttacggggg 54420

gggcgggtca ggggtgagcc ctgggtggcc gtgcagtttc agttatthtt agcagtgcac 54480

tgthtgagga aaaattacct gtcttgactt cctgtgttht tcatcttaag tattgttaag 54540

tgctgtgtat ggatctcatt gtagtcatac ttgtthtccc cagatgaggc acttggtgaa 54600

taaaggatgc tgggaaaact gtgtgttata ttctgttgca ggtagtctgg ctgtatthtg 54660

aaagttgcaa agaaggtaga tttgggggca ggaaaaacaa ccctthtcac agtgtactgt 54720

gtthggttg tgtaaaactg atgcagatth ttctgaaatg agatgtthtag atgagcatac 54780

tactaaagca gagtggaaaa atctgtctth atggtatgth ctaggtgtat tgtgattthc 54840



tgtagattg ccaatataag taaatataga cataatctat atatagtgtt tcacaaagct 54900

tagatcttta acctgcagc tgccccacag tgcttgacct ctgagtcatt gggtatacag 54960

tgtagtcca agcacataaa ctaggaagag aatgtatttg taggagcgct accacctgtt 55020

ttcaagagaa catagaactc caacgtaacc gtcatttcaa agatttactg tatgtatagt 55080

tgattttgtg gactgaattt aatgcttcca aatgtttgca gttaccaaac attgttatgc 55140

aagaaatcat aaaatgaaga cttataccat tgtgtttaag ctgtattgaa ttatctgtgg 55200

aatgcattgt gaactgtaaa gcaaagtatc aataaagctt atagacttaa aacctttgtg 55260

tttagtgttt tagtttcatg aatgcacagc aaaaacacgg tggtaggctt agagagtgga 55320

cacatggtaa catgctttta gaaaggtttt agttcatgaa acagcttaag aacaaagaat 55380

atatttacat agtgagattt atttgactca taacaaaagg ttttaaatta ttttatactt 55440

tgaaaataaa ttcatgcacc aatatittaa cagaatacag tgcaagattt atgaatatac 55500

ataaaattac accatataaa ttttacaat aagactttca aagtctttat aacagacact 55560

attgctcttc aaatatatac atatatcatt gattagtcag ttgttcatcc acatggttac 55620

ttaatgcaag atctgtctga atgaaatgtc agtagtacia gacaggcaga cacagtgatc 55680

actcagcatc accaggtaca gaaaacagaa tcagggtctc atagggtctt actgaggacc 55740

cagcaacctg ctagtgggtt gatgtaaggc attaataagt tggcgtgtaa aatagcttaa 55800

tgtgtaatct aattctttta gaatgctgaa gcacttctgt ggtaaagtgt gataatctat 55860

tctttaactg aaaatgctta tttcaacctt tctctaaaat ggcaacttca tataactaga 55920

aactcaaggt ctagaatttt agtgcacaga ctggaaggac tcggtggtgt gtgtactcac 55980

gactccaact cccatcagcc ttcttaacta atagtcgtca agtcacattc tgtccgacaa 56040

ctgactggag aaactcaaat actccttaca gtggggaata tgttcaagag gtttttaaaa 56100

atctgaattt accctgcatt aatcatctga aatgagcaga gccaagccag tcctacccaa 56160

gagggtgtaa actaaacagc aagacagctc actcgtcaca ctggagcttt ccctgctttc 56220

cgtgttgcta ctttctgtgg agctggactc ttctttgctg ctcaccttat aactgctttc 56280

ctagagcagg acatagtggg gaatttgcta atcccatagc cctcctcagt tttgaagttt 56340

tagcaccatg tgaaggaaga agacgacatg ggaggtgagg cagcagccca cacaactggg 56400

aactttgaag gcacttaatg gatataaaac tgcaaatgaa acttttataa attaacattt 56460

taaaacttgt ttatacatgg ctcatctagt tttgaaagct aaatgtggca aacagggtat 56520

ttctgtactt aagtgttcc aacttacatt gtgtccagtg aacattctta aaatacatag 56580

aaacagaata gcaaaacacc tttgtaaaag tcttaatgca aattaaacgc tacatattgg 56640

ttagggtaat tgaggatgta aattttatct gtgggctaca tcatcccaat tttgccgtta 56700

gtgaagttac aataagtata ggttttagtc tccagaacag aagcaaacag tcttagtatt 56760

cattcttggc atcaccatct tgcaaagttc agattatgag agtcctacaa catctctgtt 56820

cagagcttgt gtgtcccaca gcagttggcg tcgaggaggt gcccctgcac tgcctacaag 56880

tagcttggga gaagcagcca tagtgcacgg ggttccagtg ttacagaca tcgccacaca 56940

aatacactga aaggcaaacg acatttttgt gtggtcagat actataatgc tgccaagtgt 57000

tccagactga aaagtgtaaa ccatttgcag cctactctcc ttccccgtca tcacttgggc 57060

tttttttgtt tttttttaag gttttttttt ggggggggtt gggtgaataa ggttttacta 57120

tgtagtctga ggattataga tgtgagccac catgtctggt ttactgttct tttttggaac 57180

agttctttga tgtgtgtctc ccttagactc cttttgctgc tttgagcatt tgtgcataat 57240

gaagtcactg gagacttggc agcccaacct cacactatct gtcctgtgac tattgaagag 57300

ggttgagtgt gtttgaatgg agcccctttt acatgttata caccatgtcc tcaaggcctt 57360

atgcttttaa gttactttaa gtcttgtttg taaacagaag tcactttgta tttcctgcac 57420

tgggctggcc agttcgttta ggccttttct tccaacttg ttctgtttgg ctggtactgt 57480

ttggaatgaa tgttcattat tccaaaggaa ctggtgtaag taagtactac cccaagcaat 57540  
aatccccgca atagctagca cagttagctg gaggtggctc agcaggcagg ccatcacggc 57600  
gcactgtgtt ctttataggt gcctctctta caatttgact cagatcacta aaaacatcaa 57660  
aatattattg taatagttaa aaattaattt tgtgcctgta cacatacacg tgcaagctca 57720  
atttcaaggg tgggttctct gcactcaggt tatcaggctt gctagaccg ttttactttt 57780  
tcagctaccc ctgagttttt attaaacaaa aacaatatat ggtaatgtaa taaaaccttt 57840  
aaatatattg aaattgagtt atagaatgac ctggctcctg cctctccata tgctaggaaa 57900  
ccctctccta cctcagaaaag aggcttgcag acctatgggt taggttggaa gggttccttc 57960  
cttctaaaac aatggcttcc aaaccatgct tcaggccaaa taacctgcat atttcacctg 58020  
acggccaaaa gctgccttgg ctctttgtcc aaatagctcc ttggacttgg gccatggact 58080  
ggccctaaga ctcagcatct cccgtttctc atggcaactc attgcctcc actatttctt 58140  
agtgtcacta aaggctccat gttattagca tctttaaact taagaagatg ttattagcat 58200  
cattaagcta ggctggcaat tctcaaggac aaatgggtga aggttgattt aacctgattc 58260  
tcagtattg tttctactaa agttagccat tccagatttc ttaccctgtg cctctcgccc 58320

cccagcaatg tttagctgtc atagaacctg agctcagcca atcccaggag agccctagag 58380

gggacacggg cctgccaaaa ttgtttgaga acgccaacaa cagaatatgg taggaaattt 58440

ttggttttcc cctaaaaact cgtgaaattt ctttcttatt gttccatata agacccttcc 58500

tgtgtccctg gcagagcctg gccacagga caccccaact agcagaactg cccgaggagc 58560

caaccaaatt aatctggtac aacctgcagt cgtctcctcc tgtgctgacc acatacttgt 58620

catcggaaga gaagcggatg ttcgtcacat gagcagagt accaaagtaa cgtttgtgt 58680

tggcctgtga ggaaaagcaa acgcagcggc tgagcacatg ttgaccccag taacttgttg 58740

ggttattgat ccaccagctg cccacttcc agaagcccc actgctctgt gtgcagaagg 58800

ccttgatgag aagggtgcct gccgtggcct tgcactttcc cttactctta aggctgtaga 58860

cttctctccc ctgatgccca ggctcaagtc tcaacagtaa gcactgcact ttccagggtgc 58920

atcaatcagc cacccttgct gatttccctg cctgatttct tccccaactt tgtggccatt 58980

tgtccattca ccaggggcaa gccaaagccc catggggctg gatccatgat aactgaaggt 59040

catctatatg actgtatagg agcatgggcc ggagacagct caggaggact cacgaatttt 59100

tctgtgcatg gaaaatcaaa gagcttcagc agcccgaagt catcccctgt gacaatgttc 59160

aagccagcat gggtcacaca tgcacagttg acatcagcct tgtctgcgtt tcgtggccag 59220

attccaatga cttcatctcc gagaacactg ttccaagagg aaaaggtatt aggaagatgg 59280

gacatagttt cctagggttg ttgtcccctc ctaaggtaaa aagtagatag gaattgtagg 59340

tcatttggtc acgtgggcac accctgctct gcattttcac caccaggcac agcccttccc 59400

caactcccct acattccaga aagaaaactt ttattttatt ttttcttctt tatagtcca 59460

ctgaatatgt atgttgga ggcagaggtt cctgtacctt ttatctttag gttactagaa 59520

gcttcattgt tgctgggctt ggcaaaacat ttgaacttgc tgaatgtggc ttgggggttg 59580

tacgaatgat taaacaaaaa gaaagccctg atgcataaa atcctcccct aagccagtgt 59640

ctagcagctt tgcctcctcc cccactgaga aaagacagtt tcctctcagc tcttcctatc 59700

ctggccatca caaacccaga ggcagagctg gggcctcttc ctcaaccaga gttctcttca 59760

tttaccttgt ccaggaagcc caggtgatct tctcaacaac catggcttca gttacttgct 59820

tccccagggg aacttcatgt acttggcgct tataggctcc tgttgacacc tgcaagagga 59880

gaggaactga gtccatctgc ttcctcagtt ccacagactc tcttggctgt ctttcccaac 59940

actaactctg cccagttac gcttttcttt aaatccaaac tcagctcctg gctacaaagc 60000

caataaacag tccgttgccc cacagcccat gctaaaattc ataggtaggg tgtgttctac 60060

ctccccaacc cctgtcaaca cacaacagcc tatgttaaaa ttcagagtat cttctatcca 60120

tttctacccc caccacgagg gatggtgaac atgtcaagtg ccctcttgga gtctcctaaa 60180

ggaaactggc cactgttttc acattaaagg acacttgcca gtgtcttaca tcctaggtct 60240

cttctctccc catggggatg gtgtctctac ccatgtcacc agggttttcc ttgagttcat 60300

ggaaagatcc taaatctttc ccacctcagg ttttcaatgc agatggcttg ggacagaaat 60360

cctgccccct ttgttaactc cctcctacag ggcagacatt gctcagccta acgaatgctt 60420

ttttagaagg gaggcaggtc taagttgagt gcctcttcag atgctgcctg acaagctaca 60480

ctttgccttg actgtcagtc cttgccttct ccatggaagt gtgataagct ccagaagaaa 60540

tgaacatact atatctatcc aaaagcctgc ctagctgagg ctttgttgga tacatttgaa 60600

aaatgaatataagtt 60615

<210> 10

<211> 1162

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

MetGlu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser Ala Asp Ser

1                      5                      10                      15

Pro Pro Arg Pro Pro Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Thr Glu Pro

20                      25                      30

Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu

35                      40                      45

Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu

50                      55                      60

Ser Ala Ala Pro Val Pro Pro Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp Phe Ser

65                      70                      75                      80

Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala Ala Pro

85                      90                      95

ProThr Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu Arg Ser Pro Ala Ala

100                      105                      110

SerAla Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Leu Pro Ser Lys Leu

115                      120                      125



ProGlu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro Ala Pro Ala Gly Ala

130

135

140

SerPro Leu Ala Glu Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro

145

150

155

160

LysArg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu Pro

165

170

175

AlaAla Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser Ser Ala Glu Lys Ile Met Asp

180

185

190

LeuLys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val Ser Ser Gly Gln Glu Asp Phe

195

200

205

ProSer Val Leu Phe Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro

210

215

220

Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Ser

225

230

235

240

Ala Val Ala Ser Thr Glu Gly Thr Ile Glu Glu Thr Leu Asn Glu Ala

245

250

255

Ser Arg Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr Asn Pro Phe Val Asn Arg Glu

260

265

270

Ser Ala Glu Phe Ser Val Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe

275

280

285

Asn Gly Ser Pro Lys Gly Glu Ser Ala Met Leu Val Glu Asn Thr Lys

290

295

300

Glu Glu Val Ile Val Arg Ser Lys Asp Lys Glu Asp Leu Val Cys Ser

305

310

315

320

Ala Ala Leu His Asn Pro Gln Glu Ser Pro Ala Thr Leu Thr Lys Val

325

330

335

Val Lys Glu Asp Gly Val Met Ser Pro Glu Lys Thr Met Asp Ile Phe

340

345

350

Asn Glu Met Lys Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu Tyr Ala  
355 360 365

Asp Phe Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val Lys Asp Thr Tyr Glu  
370 375 380

Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Ala Arg Ala Asn Met Glu Ser Lys Val  
385 390 395 400

Asp Lys Lys Cys Phe Glu Asp Ser Leu Glu Gln Lys Gly His Gly Lys  
405 410 415

AspSer Glu Ser Arg Asn Glu Asn Ala Ser Phe Pro Arg Thr Pro Glu  
420 425 430

Leu Val Lys Asp Gly Ser Arg Ala Tyr Ile Thr Cys Asp Ser Phe Ser  
435 440 445

Ser Ala Thr Glu Ser Thr Ala Ala Asn Ile Phe Pro Val Leu Glu Asp  
450 455 460

His Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys

465 470 475 480

Ala Gln Ile Ile Thr Glu Lys Thr Ser Pro Lys Thr Ser Asn Pro Phe

485 490 495

Leu Val Ala Ile His Asp Ser Glu Ala Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn

500 505 510

Leu Ser Lys Val Thr Glu Ala Val Val Ala Thr Met Pro Glu Gly Leu

515 520 525

ThrPro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala

530 535 540

Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr

545 550 555 560

SerGlu Ala Ile Gln Glu Ser Ile Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro

565 570 575

SerPhe Glu Glu Ala Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile

580 585 590

ValMet Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Thr Gly Ala Ser  
595 600 605

ValAla Gln Pro Ser Ala Ser Pro Leu Glu Val Pro Ser Pro Val Ser  
610 615 620

TyrAsp Gly Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu  
625 630 635 640

AlaMet Ser Val Ala Leu Lys Thr Ser Asp Ser Lys Glu Glu Ile Lys  
645 650 655

GluPro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Ala Gln Glu Ala Glu Ala Pro Tyr  
660 665 670

IleSer Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Thr Glu  
675 680 685

ProSer Pro Glu Phe Ser Asn Tyr Ser Glu Ile Ala Lys Phe Glu Lys  
690 695 700

Ser Val Pro Asp His Cys Glu Leu Val Asp Asp Ser Ser Pro Glu Ser  
705 710 715 720

Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Glu Val Pro Gln  
725 730 735

Thr Gln Glu Glu Ala Val Met Leu Met Lys Glu Ser Leu Thr Glu Val  
740 745 750

Ser Glu Thr Val Thr Gln His Lys His Lys Glu Arg Leu Ser Ala Ser  
755 760 765

ProGln Glu Val Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu  
770 775 780

His Ile Thr Lys Asp Ala Ala Ser Asn Glu Ile Pro Thr Leu Thr Lys  
785 790 795 800

LysGlu Thr Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr  
805 810 815

SerAsn Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Met Lys Glu Ser  
820 825 830

GluThr Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro  
835 840 845

ThrPhe Val Ser Ala Lys Asp Asp Ser Pro Lys Glu Tyr Thr Asp Leu  
850 855 860

Glu Val Ser Asn Lys Ser Glu Ile Ala Asn Val Gln Ser Gly Ala Asn  
865 870 875 880

Ser Leu Pro Cys Ser Glu Leu Pro Cys Asp Leu Ser Phe Lys Asn Thr  
885 890 895

Tyr Pro Lys Asp Glu Ala His Val Ser Asp Glu Phe Ser Lys Ser Arg  
900 905 910

Ser Ser Val Ser Lys Val Pro Leu Leu Leu Pro Asn Val Ser Ala Leu  
915 920 925

Glu Ser Gln Ile Glu Met Gly Asn Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Thr

930

935

940

Lys Glu Ala Glu Glu Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg

945

950

955

960

Ser Leu Thr Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Asn Lys Thr Ser Val Val

965

970

975

Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly

980

985

990

AlaSer Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser

995

1000

1005

Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val ThrIle Ser

1010

1015

1020

Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln LysSer Asp

1025

1030

1035

Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu ValAla Ile

1040

1045

1050



Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala LeuGly His  
1055 1060 1065

Val Asn Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe LeuVal Asp  
1070 1075 1080

Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met TrpVal Phe  
1085 1090 1095

Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu LeuIle Leu  
1100 1105 1110

Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Ile Pro Val Ile Tyr GluArg His  
1115 1120 1125

Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn LysSer Val  
1130 1135 1140

Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro GlyLeu Lys  
1145 1150 1155

Arg Lys Ala Glu

1160

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 582

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 11

atggctgcc a tccggaagaa actggtgatt gttggtgatg gagcctgtggaaagacatgc 60

ttgctcatag tcttcagcaa ggaccagttc ccagaggtgt atgtgccacagtgtttgag 120

aactatgtgg cagatatcga ggtggatgga aagcaggtag agttggctttgtgggacaca 180

gctgggcagg aagattatga tcgcctgagg cccctctcct acccagataccgatgttata 240

ctgatgtgtt tttccatcga cagccctgat agtttagaaa acatcccagaaaagtggacc 300

ccagaagtca agcatittctg tcccaacgtg cccatcatcc tggttgggaataagaaggat 360

cttcggaatg atgagcacac aaggcgggag ctagccaaga tgaagcagga gccggtgaaa 420

cctgaagaag gcagagatat ggcaaacagg attggcgctt ttgggtacatggagtgttca 480

gcaaagacca aagatggagt gagagaggtt tttgaaatgg ctacgagagctgctctgcaa 540

gctagacgtg ggaagaaaaa atctggttgc cttgtcttgtga

582

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 193

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys

1                    5                    10                    15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu

20                    25                    30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val

35                    40                    45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu

50                    55                    60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile

65                    70                    75                    80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro

85

90

95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile

100

105

110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg

115

120

125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly

130

135

140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser

145

150

155

160

Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg

165

170

175

Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val

180

185

190

Leu

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1145

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 13

atgtccaatc ctggtgatgt ccgacctgtt ccgcacagga gcaaagtgtgccgttgtctc 60

ttcgggtcccg tggacagtga gcagttgcgc cgtgattgcg atgcgctcatggcgggctgt 120

ctccaggagg cccgagaacg gtggaacttt gacttcgtca cggagacgccgctggagggc 180

aactttgtct gggagcgcgt tcggagccta gggctgcccc aggtctacctgagccctggg 240

tcccgcagcc gtgacgacct gggagggggac aagaggccca gtacttcctctgccctgctg 300

caggggccag ctccagagga ccacgtggcc ttgtcgctgt cttgcactctggtgtctgag 360

cggcctgaag attccccggg tgggcccga acatctcagg gccgaaaacggaggcagacc 420

agcctgacag gtaaggacag agaagagaag gagaaagatc ctgcaagaggcctggagagg 480

agaggccacc atttgaggat ggcctttaca gagaacattc cagcccttccccaccaccaa 540

gccattccat aggcgtggga cctcgtgggg ctgagaggaa cagttgatccaggcattttt 600

ctctgcagtg accgaaatgc ccaggatagt gtggtgattg gcagtagagctctaagaagg 660

gagccgggct gaagagatgg ctcagcactt actcttgctg agggcctgagttcgattccc 720

agcaccggaa atgacaactt cctataacta actctgggcg ttgggggatctaccctctct 780

agagccctgt ccctctgacc aggaggtggt gtgccctgtg gctgtggcttttccccacga 840

tgagccacat gtccttaga ctctggggaa tgatgtcctt ccccttggcatctggcctga 900

catctgttct ctctccacag atttctatca ctccaagcgc agattgggtcttctgcaagag 960

aaaaccctga agtgcccacg ggagccccgc cctcttctgc tgtgggtcaggaggcctctt 1020

ccccatcttc ggccttagcc ctcaactctgt gtgtcttaat tattatttgtgttttaattt 1080

aaacgtctcc tgatatacgc tgccctgccct ctcccagtct ccaaacttaaagttatttaa 1140

aaaaa 1145

<210> 14

<211> 159

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Ser Asn Pro Gly Asp Val Arg Pro Val Pro His Arg Ser Lys Val  
1 5 10 15

Cys Arg Cys Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Arg Arg Asp  
20 25 30

Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Leu Gln Glu Ala Arg Glu Arg Trp  
35 40 45

Asn Phe Asp Phe Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asn Phe Val Trp  
50 55 60

Glu Arg Val Arg Ser Leu Gly Leu Pro Lys Val Tyr Leu Ser Pro Gly  
65 70 75 80

Ser Arg Ser Arg Asp Asp Leu Gly Gly Asp Lys Arg Pro Ser Thr Ser  
85 90 95

Ser Ala Leu Leu Gln Gly Pro Ala Pro Glu Asp His Val Ala Leu Ser  
100 105 110

Leu Ser Cys Thr Leu Val Ser Glu Arg Pro Glu Asp Ser Pro Gly Gly

115

120

125

Pro Gly Thr Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln Thr Ser Leu Thr Asp

130

135

140

Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Val Phe Cys Lys Arg Lys Pro

145

150

155

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 15

Gly Gly Trp Lys Trp Trp Pro Gly Ile Phe

1

5

10

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 3259

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus



&lt;400&gt; 16

cagctccggc gggcagcagg cgctggagcg catcgagtt cagctcagcgagcaccatc	60
ggtctgcgga gcggactgag ctagaagcgg agcgctgacg ccggaggcgtgcaatgagga	120
gggcaggtgc tgcctgcagc gccatggacc ggctg'gcct gctgctgctgctgattctag	180
gggtgtcctc tggaggtgcc aaggagacat gttccacagg cctgtacacccacagcggag	240
agtgtgcaa agcctgcaac ttgggcgaag gcgtggccca gccctgcggagccaaccaga	300
ccgtgtgtga accctgcctg gacaatgtta cattctccga tgtggtgagcgccactgagc	360
cgtgcaagcc gtgcaccgag tgcctgggcc tgcagagcat gtccgctccctgtgtggagg	420
cagacgatgc agtgtgcaga tgtgcctatg gctactacca ggacgaggagactggccact	480
gtgaggcttg cagcgtgtgc gaggtgggct cgggactcgt gttctcctgccaggacaaac	540
agaacacagt gtgtgaagag tgcccagagg gcacatactc agacgaagccaaccacgtgg	600
accctgcct accctgcacg gtgtgcgagg aactgagcg ccagttacgcgagtgcacgc	660
cctgggctga tgctgaatgc gaagagatcc ctggctgatg gatcccaaggtctacgcccc	720
cggagggctc cgacagcaca gcgccagca cccaggagcc tgaggttcctccagagcaag	780
accttgtagc cagtacagtg gcggatatgg tgaccactgt gatgggcagctcccagcctg	840

tagtgacccg cggcaccacc gacaacctca ttctgtctta ttgctccatcttggctgctg 900

tggtcgtggg ccttgtggcc tatattgctt tcaagagggtg gaacagctgcaaacaaaata 960

aacaaggcgc caacagccgc cccgtgaacc agacgcccc accggagggagagaaaactgc 1020

acagcgacag tggcatctct gtggacagcc agagcctgca cgaccagcagaccatacgc 1080

agactgcctc aggccaggcc ctcaagggtg atggcaacct ctacagtagcctgcccctga 1140

ccaagcgtga ggaggttagag aaactgctca acggggatac ctggcgacatctggcaggcg 1200

agctgggtta ccagcctgaa catatagact cctttacca cgaggcctgcccagtgcgag 1260

ccctgctggc cagctggggt gcccaggaca gtgcaacgct tgatgcccttttagccgcc 1320

tgcgacgcat ccagagagct gacattgtgg agagtctatg cagcgagtccactgccacat 1380

ccccagtgtg aactcacaga ctgggagccc ctgtcctgtc ccacattccgacgactgatg 1440

ttctagccag ccccccacaga gctgccccct ctccctcggg gatggcccaa cggtcagaac 1500

ggagcatctc tgtgcagggc ctctgtgttc cactcctga ctccgttgctgctcccgagg 1560

gggcccttgc ttctgaccac cctctcctca gcaagagaga gagagaggaccacccgagcc 1620

tgacttgctc catttccatc tcaggccttt ccttcctttc tacacattagctgtgtcaga 1680

tctgggggtt tgacactagg agaagggagc gggggcaccc ctaagactcaggaggtactg 1740

aagaaccaga gccatggact ccacactgtg aaccggagaa caaggggcggggcattgttg 1800

taggctagac cttccttagc ccctcccttc tcccctctgg ccaaagaagaggattacgga 1860

cctatctgag ctgaaagcag gtttgggaacc cagcccacac ttctctctca cacacaggat 1920

ggtaaaaccc agagaaaggc agggactgac ctaggccacc caaccacaggaagaacaaat 1980

gaaggctgat acactccgtt tctgaatgag ggcgtcaagt gtgcttgttgacagggatgg 2040

cgtgactttc agggaaatat ctggaagcca tgtctgcccc gccctcaaccacttccaggc 2100

ccctaccaa cccttgtgca gatgaactgt ttgttcaagg gctgggtccattgggtctattc 2160

tgatggagtc aagctaaggg ctcaggctta tccataaggc atttgtggagagatgaatct 2220

gttagtgcg ctcattcttgg cataagcctg aagccaacac ggcccttaatgtcagccctc 2280

ggggtcagga accaaggact cccacccac aatccaacac tatactacattacacacaca 2340

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaga tatcttgcttttctcccat 2400

ggctcttttg gggctgagac tagatcctgc tgggagtcac tgccagtgagagatccggag 2460

gggacagagc tgagcttcat ggggctgtct tcctcgcccc cgggtctggcaggccaagaa 2520

tgactgcac tgagctgggtg tctgtcttcc aatggcctgt gcgtggaggaaatgctccca 2580

ctcctcccct tcttgaagct gccccagaa gactacagt caaaagagcagactggtgtg 2640

agaacacaag aaaaagcaga tgctggccct gcagtctgtg gcagctttctcctcagcttc 2700

aaggcccctg caaaggacgg atttcctgag cacggccagg aaggggcaagagggttcggt 2760

tcagtggcgc tttctcccgg ctctttggcc tgttctgttt tgcttgctgttggaatgagt 2820

gggcaccccc tctatttagc atgaaggagc cccaggcagg gtatgcacagactgaccacc 2880

atccctcccc acccagggtc cacccaaccc ggtgaagaga ccaggagcattgtacgcata 2940

cgcggttggt atttttatgg accccaatct gcaattccca gacacctgggaagtgggaca 3000

ttcttttgtg atttattttc ctccccagga gctggggagt ggtggggggctgcaggtacg 3060

gttagcatg tgtttggttc tgggggtctc tccagccttg ttttggccaagtgtgaacc 3120

tctggccctc cagctggtga ctatgaactc cagaccctt cgtgctccccgacgccttcc 3180

ccttgcatcc tgtgtaacca tttcgttggg ccctcccaaa acctacacataaaacataca 3240

ggaggaccattaaattggc 3259

<210> 17

<211> 425

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 17

Met Arg Arg Ala Gly Ala Ala Cys Ser Ala Met Asp Arg Leu Arg Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ile Leu Gly Val Ser Ser Gly Gly Ala Lys Glu Thr  
20 25 30

Cys Ser Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys  
35 40 45

Asn Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val  
50 55 60

Cys Glu Pro Cys Leu Asp Asn Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala  
65 70 75 80

Thr Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Leu Gly Leu Gln Ser Met  
85 90 95

Ser Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr

100

105

110

Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu Glu Thr Gly His Cys Glu Ala Cys Ser Val

115

120

125

Cys Glu Val Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn

130

135

140

Thr Val Cys Glu Glu Cys Pro Glu Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn

145

150

155

160

His Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg

165

170

175

Gln Leu Arg Glu Cys Thr Pro Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile

180

185

190

Pro Gly Arg Trp Ile Pro Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser

195

200

205

ThrAla Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Val Pro Pro Glu Gln Asp Leu

210

215

220

Val Pro Ser Thr Val Ala Asp Met Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser  
225 230 235 240

Gln Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr  
245 250 255

Cys Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala  
260 265 270

Phe Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser  
275 280 285

Arg Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser  
290 295 300

Asp Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Thr  
305 310 315 320

His Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Asn Leu  
325 330 335

TyrSer Ser Leu Pro Leu Thr Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu

340

345

350

Asn Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr Gln Pro

355

360

365

Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg Ala Leu

370

375

380

Leu Ala Ser Trp Gly Ala Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala Leu Leu

385

390

395

400

Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Ile Val Glu Ser Leu Cys

405

410

415

Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val

420

425

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、p 7 5 N T R と R h o G D I との同時免疫沈降である。

A) トランスフェクトした 2 9 3 T 細胞から調製した溶解物を用いた、p 7 5



NTRとRhogDIまたはRhogAとの同時免疫沈降。p75NTR免疫沈降物において、抗RhogDI抗体によって、RhogDIに対応するタンパク質の存在が明らかになった。

B) トランスフェクトされたN1E-115細胞におけるp75NTRとRhogDIまたはRhogAとの相互作用に対する、MAGおよびNogoの効果。データは、平均±S.E.である。アステリスクは、統計上の有意性を示す、\* ;  $p < 0.01$  (スチューデントのt検定)。

C) 小脳ニューロンから調製した溶解物を用いた、p75NTRとRhogDIとの同時免疫沈降。会合は、MAG処理細胞およびNogo処理細胞中で観察した。

### 【図2】

図2は、p75NTRがRhogDIと直接会合することを示す。

a) p75NTRと組換えGST-RhogDIまたは組換えGST-RhogAとの同時免疫沈降。会合は、精製p75NTRおよびプロテインAセファロースを用いて生成された沈降物のウェスタンブロット分析によって調べた。抗GST抗体によって、複合体中のRhogDIの存在が明らかになった。

b) RhogDIとp75NTRの欠失変異体との同時免疫沈降。この欠失変異体のための構築物の模式図を示す。示した番号は、この変異体の残基に対応する。

c) トランスフェクトした293T細胞中のRhogAのアフィニティー沈降。p75NTRの全長またはp75NTR ICDの過剰発現は、RhogAの活性化を誘発するが、第5ヘリックスを欠く変異p75NTRは、RhogAを活性化しない。

### 【図3】

図3は、p75NTRがRhogDI活性を低減することを示す。

a) p75NTRは、RhogAのグアニンヌクレオチド交換因子ではない。30分間で<sup>3</sup>H標識GDPのRhogAからの解離を誘導するこのタンパク質の能力を、測定した。GSTタンパク質またはインキュベーション緩衝液を、コントロールとして使用した。このグラフは、結合したままの初期<sup>3</sup>H-GDPの相対量

の平均 $\pm 3$ つの独立した実験からの S. E. を示す。\*、 $p < 0.01$  (スチューデントの t 検定)。

b) p75<sup>NTR</sup> HD は、インビトロで Rho GDI 活性を阻害する。Rho GDI と複合体化した RhoA の GDP/GTP 交換反応を、p75<sup>NTR</sup> HD の存在下または非存在下で決定した。 [<sup>3</sup>H] GDP 解離アッセイにおいて、Rho GDI と複合体化した [<sup>3</sup>H] GDP-RhoA からの [<sup>3</sup>H] GDP の解離を、RhoA に結合した [<sup>3</sup>H] GDP の放射能を測定することによってアッセイした。 [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S 結合アッセイにおいて、Rho GDI と複合体化した GDP-RhoA への [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S の結合を、RhoA に結合した [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S の活性を測定することによってアッセイした。黒丸、GST-p75<sup>NTR</sup> HD；白四角、GST。\*、 $p < 0.01$ ；(スチューデントの t 検定)。

c) p75<sup>NTR</sup> は、Rho GDI 活性を阻害する。Db1 で刺激した RhoA の GDP/GTP 交換反応を決定した。 [<sup>3</sup>H] GDP-RhoA-Rho GDI 複合体 (50 nM) を、90 nM GST-Db1 および示された濃度の GST 融合タンパク質とインキュベートした。黒丸、GST-p75<sup>NTR</sup> HD；白四角、GST；白三角 GST-p75<sup>NTR</sup> ICD。\*、 $p < 0.01$ ；(スチューデントの t 検定)。

d) Rho GDI の過剰発現は、MAG および Nogo の効果を破壊する。分離した小脳ニューロンの神経突起伸展に対する Rho GDI の効果を、評価した。左；コントロールプラスミドまたは Rho GDI プラスミドを用いて一過性にトランスフェクトした代表的な細胞の画像。MAG、MAG-Fc (25  $\mu$ g/ml)；Nogo、Nogo ペプチド (4  $\mu$ M)；Rho GDI、myc タグ化 Rho GDI でトランスフェクトした細胞。データは、平均 $\pm$  S. E. である。アステリスクは、統計上の有意性を示す、\*； $p < 0.01$  (スチューデントの t 検定)。

#### 【図 4】

図 4 は、Pep5 が Rho GDI と p75<sup>NTR</sup> との相互作用を阻害することを示す。

- a) p75<sup>NT R</sup>と組換えGST-Pep5との同時沈降。
- b) Pep5は、p75<sup>NT R</sup>とRho GDIとの結合を用量依存的に阻害する。
- c) 小脳ニューロンから調製した溶解物を用いた、p75<sup>NT R</sup>とRho GDIとの同時免疫沈降。この相互作用は、TAT-Pep5によって破壊された。

### 【図5】

図5は、Pep5は、p75<sup>NT R</sup>の阻害作用をサイレント化する。

a) 分離DRGニューロンを、Nogoペプチドの存在下または非存在下で24時間インキュベートし、次いで、ニューロン特異的 $\beta$ チューブリンIIIタンパク質を認識するモノクローナル抗体(TuJ1)を用いて免疫染色した。Nogo、Nogoペプチド; Pep5、TAT-Pep5。

b) DRGニューロンの神経突起伸展。MAG, MAG-Fc; HD、p75<sup>NT R</sup> HD (残基368~381)に対応するペプチド; p75 (+/+), 野生型; p75 (-/-), p75<sup>NT R</sup>遺伝子に変異を保有するマウス。データは、平均±S. E. である。アステリスクは、統計上の有意性を示す、\* ; p < 0.01 (スチューデントのt検定)。

c) 分離小脳ニューロンを、Nogoペプチドの存在下または非存在下で24時間インキュベートした。

d) 小脳ニューロンの神経突起伸展。データは、平均±S. E. である。アステリスクは、統計上の有意性を示す、\* ; p < 0.01 (スチューデントのt検定)。

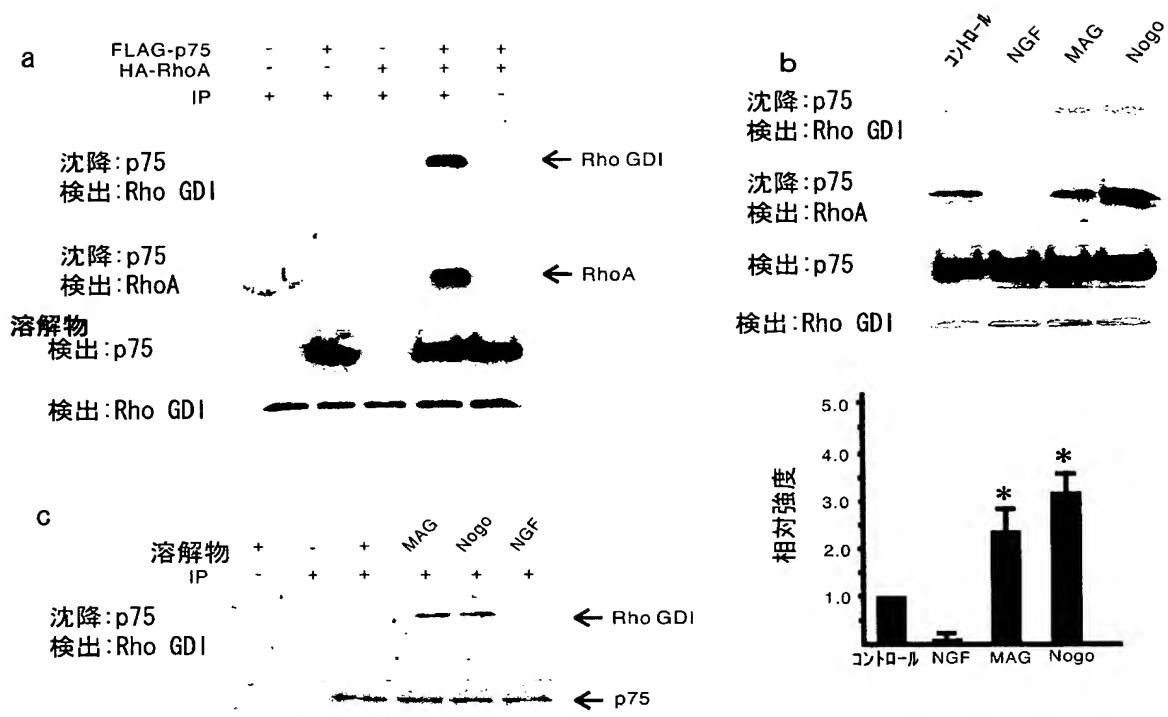
e) 小脳ニューロン中のRhoAのアフィニティー沈降。Nogoペプチド (4  $\mu$ M) およびMAG-Fc (25  $\mu$ g/ml) は、RhoAの活性化を誘発し、一方、TAT-Pep5 (1  $\mu$ M) は、これらの効果を完全に破壊した。

### 【図6】

p75のシグナル伝達経路を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

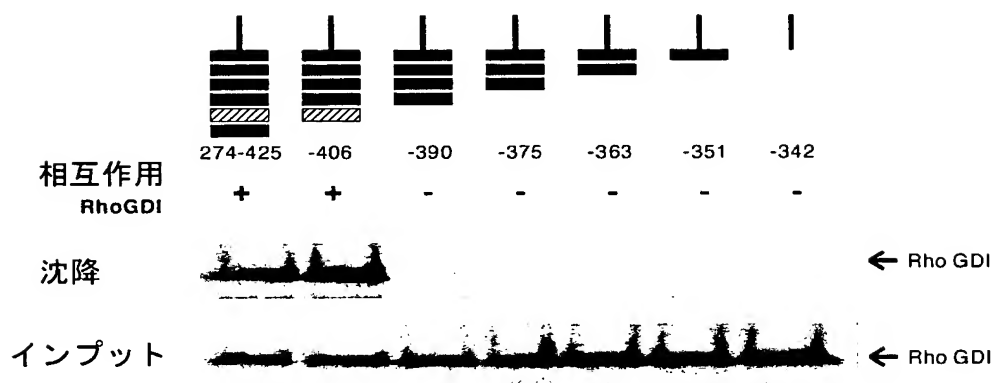


【図 2】

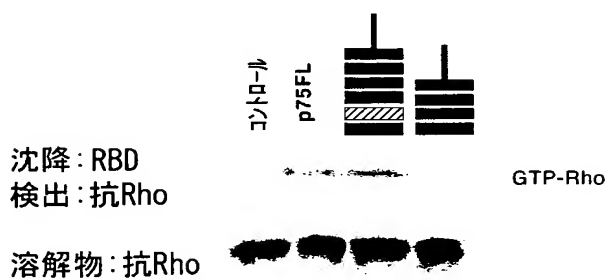
a



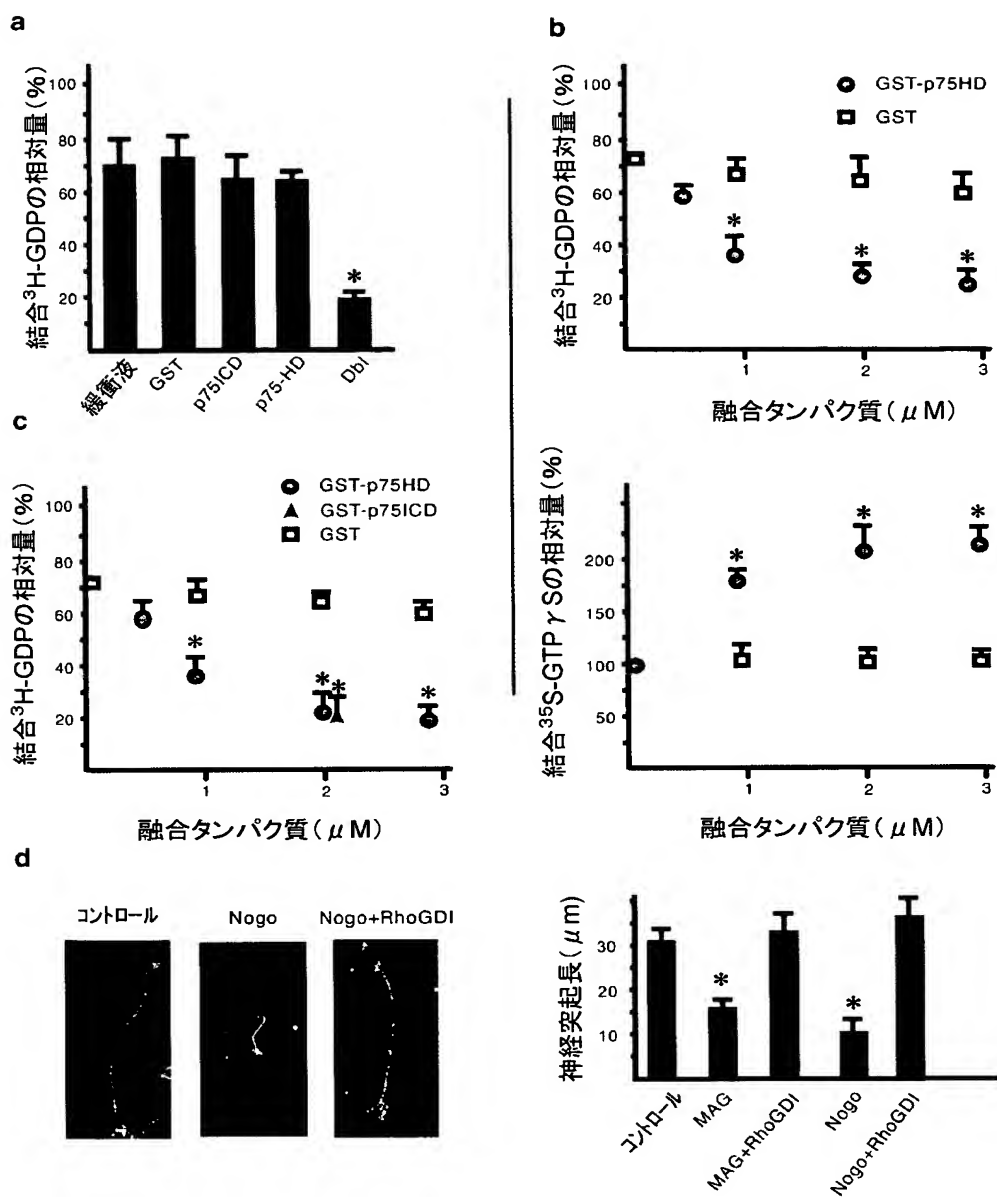
b



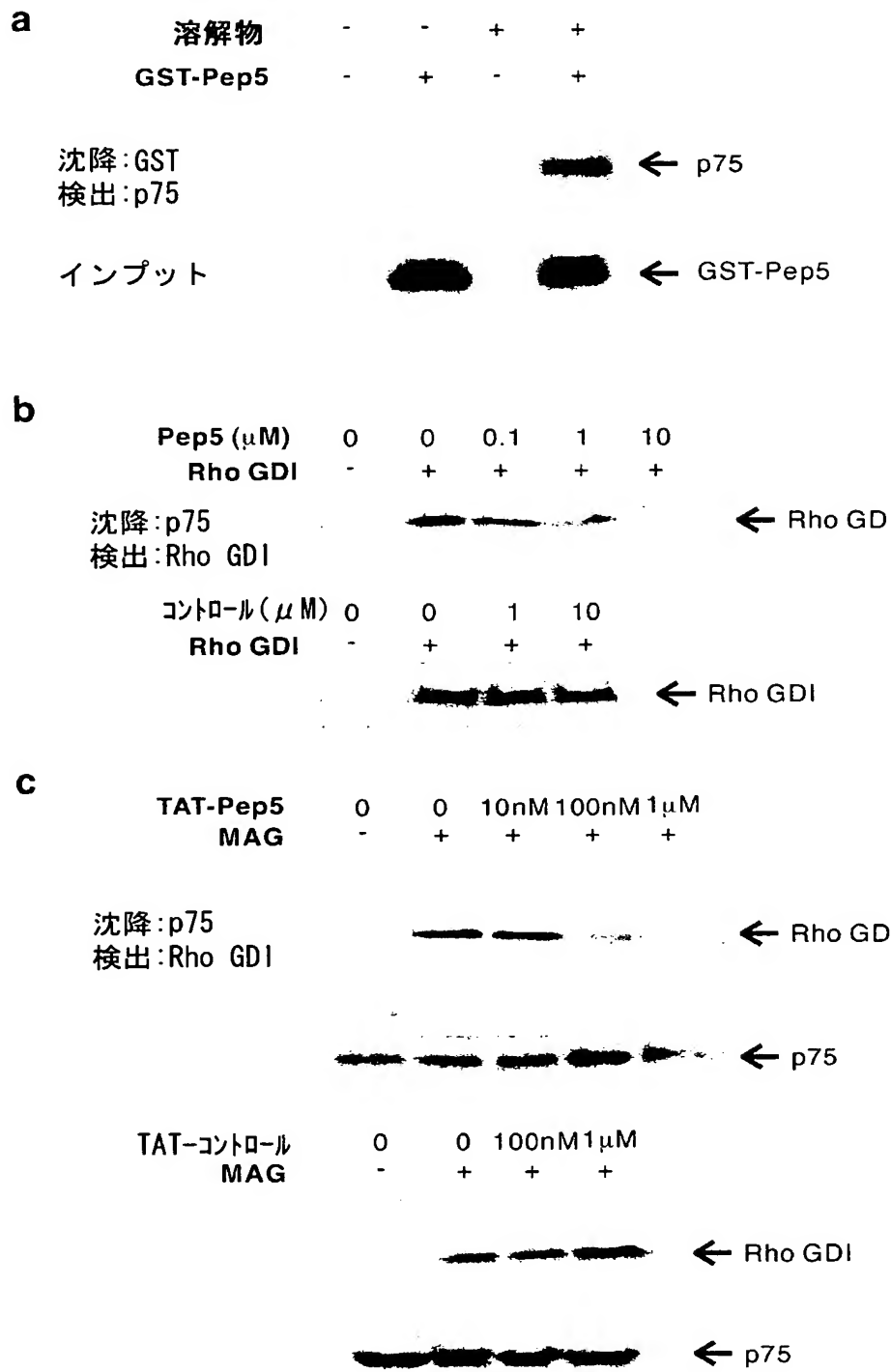
c



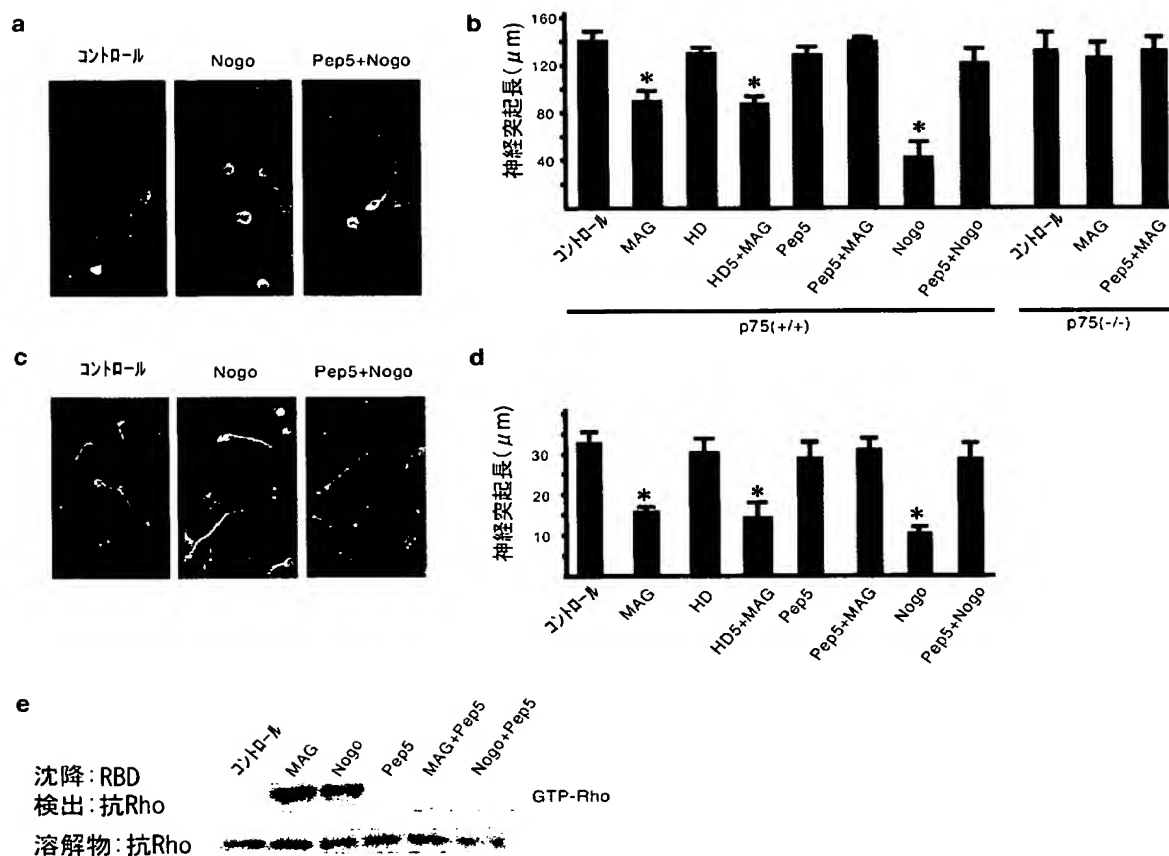
【図 3】



【図 4】

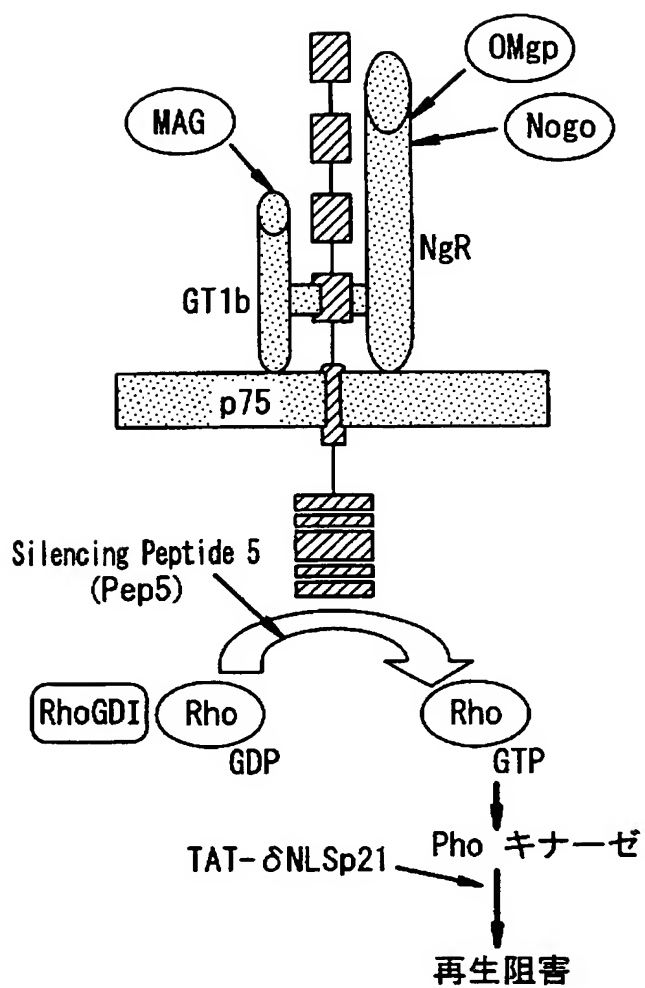


【図 5】





【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

神経の再生およびその神経の再生に基づいて神経学的疾患を処置するための薬学的組成物および方法を提供すること。

【解決手段】

上記課題は、p 7 5 シグナル伝達経路に関与する P e p 5、p 7 5、R h o G D I、M A G、G T 1 b、p 2 1 などの組成物またはそれに特異的に相互作用する因子を用いることによって、p 7 5 シグナル伝達経路を遮断または抑制することによって、再生障害がストップすることにより再生が再開することによって解決された。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 9 2 9 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 0 2 0 4 4 5 4 6 ]

1. 変更年月日 2 0 0 2 年 7 月 2 3 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都港区西新橋 1 丁目 6 番 1 4 号  
氏 名 株式会社トランスサイエンス
2. 変更年月日 2 0 0 3 年 7 月 1 6 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都千代田区内幸町 1 丁目 1 番 1 号 インペリアルタワー 6  
階  
氏 名 株式会社トランスサイエンス